

出芽酵母モノカルボン酸輸送体Jen1のグルコース応答性エンドサイトーシスに必要な選別シグナルの同定

著者	藤田 翔貴
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18245号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00123851

出芽酵母モノカルボン酸輸送体Jen1のグルコース応答性
エンドサイトーシスに必要な選別シグナルの同定

東北大学大学院農学研究科
生物産業創成科学専攻
藤田 翔貴

指導教員
新谷 尚弘 准教授

目次

凡例	...3
序論	...4

第一章

Jen1 のグルコース依存的な分解におけるアダプタータンパク質認識領域の同定

1. 緒言 ...11

2. 実験材料および方法 ...13

3. 結果

3-1 Rsp5 アダプタータンパク質による Jen1 認識領域の探索 ...24

3-1-1 Rsp5 アダプタータンパク質(*rod1*、*bul1*、*bul2*)破壊株における Jen1 の局在とターンオーバー解析

3-1-2 Jen1 部分欠損変異体のグルコース刺激に応答した分解

3-1-3 Jen1 の N 末端および C 末端領域変異体のグルコース刺激に応答した分解解析

3-1-4 Jen1 の部位特異的変異体のピルビン酸取り込み能の解析

3-1-5 Rsp5 アダプター破壊株 (*rod1Δ*および *bul1Δ bul2Δ*) における Jen1 部分欠損変異体のグルコース刺激に応答した分解

3-2 Rod1 による Jen1 認識領域の探索 ...28

3-2-1 Jen1C 部分欠損変異体のグルコースに応答したユビキチン化

3-2-2 Jen1 部分欠損変異体と Rod1 との相互作用解析

3-2-3 Jen1 の C 末端領域部分欠損変異体を用いた Rod1 結合領域の探索

3-2-4 Jen1 部位特異的変異体を用いた Rod1 結合領域の探索

3-2-5 Jen1 3A 変異体のグルコースに応答したユビキチン化

3-2-6 Jen1(3A)変異体と Rod1 との相互作用解析

3-3 Jen1 および Jen1(3A)変異体の N 末端へのエピトープタグ融合体のグルコース依存的な分解 ...33

4. 考察...34

第二章

Jen1 の C 末端領域は Rod1 を介したグルコース依存的な分解において
分解調節領域 (degron)として機能する

1. 緒言 ...38

2. 実験材料および方法 ...40

3. 結果

3-1 Jen1 のグルコース依存的な分解は基質との結合による構造変化を 必要としない ...44

3-2 Rod1 のグルコース依存的な Jen1 認識には Jen1 の C 末端領域のみで 十分である ...44

3-2-1 Rsp5 アダプタータンパク質遺伝子破壊株における Mup1 および Mup1-Jen1C-GFP の局在とメチオニン濃度依存的なターンオーバー解析

3-2-2 Mup1 と Jen1 の C 末端領域融合タンパク質 (Mup1-Jen1C)の局在と グルコース依存的なターンオーバー解析

3-3 Mup1-Jen1C キメラ輸送体の Rsp5 アダプタータンパク質による ユビキチン化制御 ...47

3-3-1 Mup1-Jen1C のメチオニンに応答したユビキチン化

3-3-2 Mup1-Jen1C のグルコースに応答したユビキチン化

3-4 Jen1 の C 末端領域はグルコース依存的にユビキチン化される ...49

4. 考察 ...50

総合討論、今後の課題 ...54

参考文献 ...59

謝辞

凡例

本文中に以下の略号を用いた。

Amp	; ampicillin
APS	; ammonium persulfate
ART	; Arestin-Related Trafficking
ATP	; adenosine triphosphate
BiFC	; bimolecular fluorescent complementation
BPB	; bromophenol blue
DNA	; deoxyribonucleic acid
EDTA	; ethylenediaminetetraacetic acid
ESCRT	; Endosomal Sorting Complex Required For Transport
ER	; endoplasmic reticulum
GFP	; green fluorescent protein
GPCR	; G protein-coupled receptor
GRC	; gap repair cloning
HECT	; Homologous to E6-AP Carboxy Terminal
IgG	; immunoglobulin G
MVB	; multivesicular body
ORF	; open reading frame
PAGE	; polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	; polymerase chain reaction
PEG	; polyethylene glycol
PVDF	; polyvinylidene fluoride
RNA	; ribonucleic acid
SDS	; sodium lauryl sulfate
TCA	; trichloroacetic acid
TEMED	; <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TGN	; <i>trans</i> -Golgi network
Tris	; tris(hydroxymethyl)aminomethane
5-FOA	; 5-fluoro-orotic acid

序論

・炭素源代謝経路の制御

ほ乳類を始めとする多くの生物は、地球上に大量に存在するグルコースを優先的に炭素源として資化する。細胞内に取込まれたグルコースは解糖系でエネルギー (ATP) とピルビン酸へと変換され、さらにミトコンドリアで好氣的なエネルギー生産に利用される。発酵産業において有用な微生物である出芽酵母においても、グルコースは優先的に使用される炭素源である。出芽酵母は、グルコース存在下では呼吸ではなく、アルコール発酵によりエネルギー生産を行うという特徴を持つ。その一方で、グルコースが枯渇すると大規模な遺伝子発現の変化を伴う非発酵性炭素源を用いた好氣的なエネルギー生産へ移行する (ダイオキシックシフト; DeRisi *et al.*, 1997)。また、このダイオキシックシフトにおいて発現する遺伝子の多くは、グルコースの枯渇とともに活性化状態となる AMP 活性化プロテインキナーゼのホモログである Snf1 キナーゼの支配下にあることがよく知られている (Hardie *et al.*, 1998)。この Snf1 は Sak1 や Tos3、Elm1 の 3 つのキナーゼによって活性化されていることも明らかとされている (Hong *et al.*, 2003; Sutherland *et al.*, 2003)。これまでに、転写活性化因子 Adr1 や Cat8 は環境中のグルコースの枯渇により活性化した Snf1 により制御されており、グルコース欠乏下で約 200 もの遺伝子の発現を活性化していることが報告されている (Young *et al.*, 2003)。Adr1 は、ペルオキシソームの増加や β -酸化、非発酵性炭素源の資化に関連する遺伝子発現の活性化に必要である (Young *et al.*, 2003)。Cat8 は、イソクエン酸リアーゼ Icl1 (グリオキシル酸回路)、リンゴ酸脱水素酵素 Mdh2 (グリオキシル酸回路、糖新生)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ Pck1 (糖新生) やフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ Fbp1 (糖新生) といった糖新生やグリオキシル酸回路関連酵素の遺伝子発現の脱抑制を担っている。さらに、Cat8 によって、ミトコンドリアコハク酸-フマル酸対向輸送体 Sfc1 や原形質膜モノカルボン酸輸送体 Jen1 といった輸送体の遺伝子発現も活性化される (Haurie *et al.*, 2001)。また、このような遺伝子発現が生じる環境中 (グルコース欠乏下) で生育する出芽酵母にグルコースを供給することで、実に 40%もの遺伝子の発現量が2倍以上変化することが報告されている (Yin *et al.*, 2003)。その代表的なものが、解糖系の酵素群やリボソームタンパク質をコードする遺伝子群の発現誘導と、上述したような非発酵性炭素源の利用に関わる遺伝子群のカタボライト抑制である (Yin *et al.*, 2003)。グルコース存在下では、Cys₂His₂ zinc-finger 型の転写抑制因子 Mig1 が広範な遺伝子 (Cat8 で制御される糖新生関連酵素遺伝子も含む) の転写を抑制している (Gancedo, 1998; Zaragoza *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2003)。Mig1 はグルコース存在下では核に局在し、グルコース非存在下では細胞質中に局在している。そして、この Mig1 の細胞内局在はリン酸状態により制御されており、脱リン酸化状態では核に局在しているが、リン酸化されることで細胞質中に局在する (DeVit and Johnston, 1999; Shashkova *et al.*, 2017)。興味深いことに、グルコースが枯渇した条件下では、Cat8 が Snf1 キナーゼ依存的なリン酸化により活性化されるのに対して、

Mig1 は Snf1 依存的なリン酸化によってその活性が抑制されている (Hedges *et al.*, 1995; Randez-Gil *et al.*, 1997)。また、グルコース存在下では、Reg1-Glc7 ホスファターゼが Mig1 の脱リン酸化へ関与することが示唆されている (Rubenstein *et al.*, 2008)。

このグルコースによる抑制効果は転写レベルだけでなく、タンパク質レベルまで及び、グルコース存在下で Icl1、Mdh2、Pck1 や Fbp1 などはずみやかに分解される (López-Boado *et al.*, 1987; Hung *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2010)。さらに、これら細胞質タンパク質だけでなく、グルコース非存在下で発現する原形質膜輸送体 Jen1 や Stil1 (グリセロール輸送体) もグルコース存在下で迅速に分解されることが報告されている (Paiva *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2005)。その他にも、グルコース存在下では様々な非発酵性の糖類輸送体の分解が活性化されている (Horák, 2013)。細胞質中に存在するタンパク質である Icl1、Mdh2、Pck1 や Fbp1 は、グルコース依存的に GID (glucose-induced degradation-deficient) システムによって分解されていることが報告されており、グルコース存在下で 8 つの因子から構成される GID ユビキチンリガーゼ (RING 型 E3 ユビキチンリガーゼ) 依存的なユビキチン化修飾を受け、プロテアソームで分解される (Hämmerle *et al.*, 1998; Santt *et al.*, 2008; Menssen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017)。さらに、その機構の詳細は不明であるが、Fbp1 と Mdh2 のグルコース依存的な分解は、グルコースが枯渇した状態が短期間 (24h) であるとプロテアソーム依存的に分解され、長期間 (72h) であると液胞へ輸送され分解されることが報告されている (Hung *et al.*, 2004)。これら細胞質中のタンパク質分解に対して、原形質膜タンパク質のグルコース依存的な分解は後述するエンドサイトーシスによって制御されていると考えられている。実際に、グルコース再添加後に Jen1 はユビキチン化され、エンドサイトーシス依存的に細胞内へ取り込まれ、液胞にて分解されることが報告されている (Andrade and Casal, 2001; Lodi *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2009)。

このようなグルコース不活性化という現象自体は古くから認識されてきたが、その支配下に置かれるタンパク質の分解機構は未だ不明な点も多く、その生理学的意義を明らかにすることは大きな課題となっている。炭素源の変化により制御される Jen1 に限らず、細胞は刻々と変化する外界環境に対して、自身の恒常性を維持するため、原形質膜上の輸送体やレセプターの種類や量を最適化 (原形質膜の再構築) し、栄養源の流入量やシグナル受容の調節を行っている。これら原形質膜を介した物質の取り込みやシグナル受容は、細胞内代謝の最上流に位置していることから、グルコースによって不活性化される輸送体の制御機構を明らかにすることは、グルコース不活性化機構を理解するために重要である。そのため、当研究室では、これまでグルコース不活性化の影響を受ける輸送体の一つであるモノカルボン酸輸送体 Jen1 をモデルに、その分解制御機構の詳細な解明を目指し解析を進めてきた。

・エンドサイトーシスを介した原形質膜の再構築

一般的に、環境変化に応答した原形質膜の再構築は必要な膜タンパク質の合成 (正) および不要な膜タンパク質の分解 (負) による正と負の協調的な制御によって行われ

ている。例えば、細胞がある栄養素の不足に直面したとき、その栄養素を供給するために必要な輸送体の合成を活性化させる。一方、過剰な栄養素の蓄積は時として有害であり、細胞の内部環境を一定に保つために、輸送体を細胞から除去し、物質の取り込みを抑えている。それゆえ、環境変化依存的な原形質膜の再構築は、細胞内の恒常性の維持に重要であるといえる。真核細胞では、原形質膜タンパク質の除去機構としてエンドサイトーシスが知られている。エンドサイトーシスとは、原形質膜が貫入し、貫入した膜がやがて小胞としてくびりとられ、エンドソームへと輸送される現象である。膜タンパク質はこの小胞に取込まれることによって、原形質膜から除去され、最終的にリソソーム（植物・菌類では液胞）に輸送され、分解される。エンドサイトーシス関連タンパク質は、(i)初期タンパク質、(ii)早期、中期および後期コートタンパク質、(iii)WASp（酵母では Las17）およびミオシン関連タンパク質、(iv)アクチンおよびアクチン関連タンパク質、(v)切断関連タンパク質に大別され、数多くのタンパク質の順序立った会合と離散によってエンドサイトーシスが行われている（Merrifield and Kaksonen, 2014）。

さらに、エンドサイトーシス依存的な原形質膜からの膜タンパク質の選択的な除去は、そのユビキチン化が引き金となって起こることが知られている。真核生物において、ユビキチン化が引き起こすタンパク質の分解には、（1）プロテアソームが分解酵素として働く「ユビキチン・プロテアソーム系」と（2）細胞内の分解コンパートメントであるリソソーム・液胞に基質を輸送し分解する「リソソーム・液胞系」の2つの経路が存在する。エンドサイトーシスによる膜タンパク質の分解は、「リソソーム・液胞系」の分解経路に分類される。また、エンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれた標的タンパク質は、エンドソーム膜上で ESCRT 関連タンパク質により認識されてエンドソームのルーメン内へと取り込まれ、最終的に液胞へ輸送される Multivesicular body (MVB) 経路を経由することが知られている。

真核生物における原形質膜タンパク質のエンドサイトーシスのほとんどは、Neuronal precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (Nedd4)ファミリーに分類される E3 ユビキチンリガーゼ（Boase and Kumar, 2015）が触媒するユビキチン化によって制御されている。これまで、外界環境のシグナル変化により誘導されるユビキチン化とエンドサイトーシスの制御機構の解明は、出芽酵母とその様々な輸送体をモデルとして用いた解析が先行してきた。その結果、栄養源の過剰、枯渇といったような外界環境の変化に応じた各輸送体の制御は、実際に標的タンパク質のユビキチン化およびエンドサイトーシスによって制御されていることが明らかとなってきた（Lauwers *et al.*, 2010）。

また、いくつかのエンドサイトーシス関連タンパク質はユビキチン結合ドメインを持っており（Table 1）、これら制御においてもユビキチンが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。例えば、最も早期に標的カーゴへと集合する足場タンパク質 Ede1 はモノユビキチン結合部位（ubiquitin-associated (UBA)ドメイン）を持っている。この Ede1 のエンドサイトーシス部位への局在は、Ubiquitin regulatory X ドメ

インを持つ Ubx3 や、Ubx3 と直接相互作用するユビキチン制御因子 Cdc48 によって制御されていると考えられている (Farrell *et al.*, 2015)。さらに、少なくとも脱ユビキチン化酵素 Ubp2 および Ubp7 は、Ede1 の脱ユビキチン化を担っていることが報告されており、Ubp2 や Ubp7 および Ede1 の脱ユビキチン化は、エンドサイトーシスのコートタンパク質がエンドサイトーシス部位から乖離するために必要であることが示唆されている (Weinberg and Drubin, 2014)。この Ede1 に加え、膜の湾曲に必要なエプシン Ent1 は、ユビキチン化されたエンドサイトーシスの標的タンパク質と結合し、エンドサイトーシスを開始するために必要であることが示唆されている (Shih *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2003; Toshima *et al.*, 2009)。Ent1 および Ent2 (Ent1 のパラログ) もモノユビキチン結合部位 (ubiquitin interacting motif (UIM))を持っている。これまでに、*ENT2 EDE1* 二重遺伝子破壊株において Ent1 の UIM を欠失させると、 α -ホルモン受容体 Ste2 のエンドサイトーシスが抑制されることが報告されている (Shih *et al.*, 2002; Toshima *et al.*, 2009)。その他にも、膜が陥入する際のアクチン重合に必要な因子 Sla1 や Rvs167 は、Rsp5 と直接相互作用しユビキチン化されている (Stamenova *et al.*, 2004)。さらに、Sla1 は、SH3 ドメインを介してモノユビキチンやユビキチン化されたタンパク質と結合することが報告されている (Stamenova *et al.*, 2007)。また、Sla1 の SH3 ドメインは多くのエンドサイトーシス関連タンパク質がもつ PXXP モチーフと結合することができるが、遊離ユビキチンと SH3 ドメインが結合すると、PXXP モチーフとの結合能が失われることが明らかとされている (Stamenova *et al.*, 2007; Tonikian *et al.*, 2009)。すなわち、ユビキチンによって Sla1 とエンドサイトーシス関連タンパク質間の相互作用が制御されていると考えられている。

ユビキチンは真核生物で高度に保存された 76 アミノ酸残基からなる小さなタンパク質で、酵素反応により標的タンパク質中の特定のリジン残基側鎖に共有結合する (Pickart and Eddins, 2004)。また、ユビキチン中に存在する 48 番目および 63 番目のリジン残基にも特異的に結合し、ポリユビキチン鎖となることも知られている (Peng *et al.*, 2003)。よって、タンパク質のユビキチン化修飾にはモノユビキチン化、マルチユビキチン化 (標的タンパク質中の異なるリジン残基に対するモノユビキチン化)、ポリユビキチン化の 3 種類の修飾が存在する。これまでに、プロテアソームで分解されるタンパク質はポリユビキチン化修飾されるが、そのポリユビキチン鎖はユビキチン中の 48 番目のリジン残基でユビキチンが連結していることが明らかとなっている。その一方で、63 番目のリジン残基で連結したポリユビキチンによる修飾を受けたタンパク質は、プロテアソームの標的にはならず、エンドサイトーシスや DNA 修復など多様な機能を持つことが示唆されている (Glickman and Ciechanover, 2002)。また、標的タンパク質はユビキチンによる修飾状態の違いで異なった制御を受けていることも明らかとなってきた。例えば、出芽酵母の高親和性アミノ酸輸送体である Gap1 は、細胞膜上でモノユビキチン化修飾されることでエンドサイトーシスの標的として認識されるが、ゴルジ体から MVB 経路への輸送されるときポリユビキチン化修飾されている (Risinger and Kaiser, 2008)。また、初期エンドソーム膜上では、エンドサイトーシスに

よって取り込まれた膜タンパク質が脱ユビキチン化され、再利用のため再び原形質膜上へと輸送される経路も存在する (Eden *et al.*, 2012)。このように、膜タンパク質のユビキチンによる修飾状態は、そのタンパク質の運命を決める上で重要である。

・ Rsp5 による原形質膜タンパク質のユビキチン化

このような標的タンパク質のユビキチン化は、ユビキチン活性化酵素 (E1)と、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3)の 3 つの酵素群の働きにより行われ、最初のステップである E1 酵素へのユビキチン結合では ATP が消費される。また、ユビキチンリガーゼである E3 酵素には基質特異性があり、標的タンパク質を認識し、そのリシン残基にユビキチンを結合させたり、ポリユビキチン鎖を伸長させたりする役割を担っている。出芽酵母における輸送体やレセプターのエンドサイトーシスでは、ヒト Nedd4 のホモログである Rsp5 (Huibregtse *et al.*, 1995)が E3 酵素として機能していることが広く知られている。Rsp5 は HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) 型 E3 ユビキチンリガーゼであり、C 末端領域にユビキチン結合能を有する HECT 触媒ドメインを持つ。また、Nedd4 ファミリーでは、プロリンが豊富な PY モチーフ (PPXY モチーフや PXY モチーフ) に対する結合能を有する進化上高度に保存されている WW ドメインを 2~4 つことが知られており、Rsp5 は 3 つの WW ドメインを保持している (Bedford *et al.*, 1997; Boase and Kumar, 2015)。しかしながら、Nedd4 ファミリーの標的の多くは PY モチーフを欠如しているため、PY モチーフを保持する細胞質または膜貫通タンパク質をアダプターとして利用することで間接的に標的の認識を行なっている。出芽酵母においても、多くの原形質膜タンパク質は PY モチーフを欠如しており、Rsp5 と直接相互作用することができない。そのため、エンドサイトーシスカーゴへのユビキチン付加は、 α -アレスチンから構成されるアダプタータンパク質と呼ばれるタンパク質群がその機能を介助している (Lauwers *et al.*, 2010)。 α -アレスチンの解析は出芽酵母において盛んに行われており、10 の ART (Arrestin-Related Trafficking adaptor)ファミリーと呼ばれるアレスチン様タンパク質群 (Lin *et al.*, 2008; Nikko and Pelham, 2009)に加え、Bul1、Bul2、Bul3(Merhi and Andre, 2012; Novoselova *et al.*, 2012)および Spo23 (Aubry and Klein, 2013)がアダプタータンパク質として機能することが明らかとされている。動物細胞においても、 α -アレスチン TXNIP や ARRDC1/3/4 が G タンパク質共役型受容体 (GPCR)や細胞接着分子 β integrin、グルコース輸送体のエンドサイトーシス依存的な分解において、アダプターとして機能していることが報告されている (Parikh *et al.*, 2007; Draheim *et al.*, 2010; Nabhan *et al.*, 2010; Patwari *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Waldhart *et al.*, 2017)。 α -アレスチンタンパク質は共通して N 末端および C 末端 arrestin-fold ドメインを持ち、複数の PY モチーフを保持している。そして、その PY モチーフを介して Nedd4 ファミリータンパク質を標的へとリクルートしていると考えられている。また、出芽酵母ではアレスチン様タンパク質の他にも、Bsd2、Tre1/2、Ear1、Ssh4 も同様に PY モチーフを保持しており、アダプタータンパク質としてタンパク質のユビキチン化に関与している (Lauwers *et al.*, 2010)。すなわち、細胞は外界環

境の状態に応じてアダプタータンパク質を使い分け、数多くある輸送体の中から適切なものを選択的に分解しているのである。それゆえ、外界環境に応じた原形質膜のリモデリングにおいてアダプタータンパク質の働きは重要なものであるといえる。

これまでに、当研究室の大橋により、出芽酵母の遺伝子ライブラリーから α -アレスチンである *ROD1* 遺伝子破壊株がグルコース依存的な Jen1 分解の遅延株として見出された (大橋優隆修士論文、2010)。また、同時期に Becuwe らによっても、Jen1 のグルコース誘導性の分解におけるアダプターとして Rod1 (Art4) が機能することが報告された (Becuwe *et al.*, 2012)。さらに、葛西により Jen1 の膜上からの取り込みでは、Rod1 以外にも Bul1、Bul2 が関与していることが示唆された (葛西寛一修士論文、2011)。また、エンドソーム膜に局在する Rsp5 アダプター Ear1 と Ssh4 が Jen1 の MVB への取り込みに必要なことが示された (机伸太郎修士論文、2008)。興味深いことに、Rod1 はグルコース依存的に *trans*-Golgi network (TGN) の膜上の Jen1 のユビキチン化も仲介し、液胞へと輸送していることが明らかとなってきた (Becuwe and Léon, 2014)。TGN において、Gga (Golgi-associated, γ -adaptin homologues, Arf-binding) タンパク質は、ユビキチン化された積荷タンパク質を認識し、クラスリン小胞の形成を促す役割を持ち、TGN からエンドソームへの輸送に関与している (Scott *et al.*, 2004)。Becuwe らにより、Rod1 依存的に TGN 膜上でユビキチン化された Jen1 は、TGN に局在するクラスリンアダプター Gga1/2 依存的にエンドソームを経由し液胞へと輸送されることが明らかとされた。

・栄養源シグナルによる原形質膜輸送体の分解

近年、環境の変化に応答したリン酸化修飾によるアダプタータンパク質の活性の制御機構も明らかとなってきた。Becuwe らは、Rod1 自身の脱リン酸化およびユビキチン化がグルコース誘導性の Jen1 のエンドサイトーシスに必要であることを報告している (Becuwe *et al.*, 2012)。興味深いことに、Snf1 キナーゼや Reg1-Glc7 ホスファターゼは Jen1 の転写制御のみならず、タンパク質レベルでの制御にも関与していることが明らかとされている。グルコース枯渇条件下では、活性化した Snf1 により Rod1 はリン酸化され、不活性化状態となる。一方で、グルコース存在化では、Rod1 は Reg1-Glc7 により脱リン酸化され、Jen1 のユビキチン化を仲介している (Figure 1, Shinoda and Kikuchi, 2007; Becuwe *et al.*, 2012)。

このような外界からの刺激に応答した脱リン酸化によるアダプタータンパク質の活性化機構は、その他の輸送体や受容体の分解においても報告されている (MacGurn *et al.*, 2011; Merhi and André, 2012; O'Donnell *et al.*, 2013; Alvaro *et al.*, 2016)。例えば、Gap1 の分解に関与する Bul1 は低窒素源環境下では Npr1 キナーゼによってリン酸化され不活性化状態となるが、十分な窒素源存在下では Npr1 キナーゼは不活性化し、脱リン酸化された Bul1 が Gap1 の分解に貢献している。また、この Bul1 の脱リン酸化には Sit4 ホスファターゼが必要であることが示唆されている (O'Donnell *et al.*, 2013)。これまでに、Bul アダプターだけでなく、アダプタータンパク質 Art1 や Art2、Art3 もまた Npr1 によるリン酸化によって制御されていると考えられている (MacGurn *et al.*, 2011)。

Npr1 は Target of rapamycin 複合体 1 (TORC1)キナーゼによって制御されており、高窒素源（細胞内アミノ酸量が充足している）条件では TORC1 依存的に高度にリン酸化され、不活性化型となることが明らかとされている。その一方で、低窒素源環境下やラパマイシン処理によって TORC1 が不活性化型となると、Npr1 のリン酸化が抑えられるとともに、低レベルまで脱リン酸化され、活性化状態となる。さらに、Npr1 の脱リン酸化には直接的または間接的に Sit4 が関与していると考えられている (Figure 1, Schmidt *et al.*, 1998; Gander *et al.*, 2008; MacGurn *et al.*, 2011; O'Donnell *et al.*, 2013)。

しかし、限られたアダプターで、どのようにして膨大な原形質膜上のタンパク質から選択的に標的タンパク質のユビキチン化を仲介し、エンドサイトーシスを誘導しているのか、その全容は明らかとなっていない。さらには、未だアダプタータンパク質と標的膜タンパク質が直接相互作用していることが示された例は少なく、Rod1 と Jen1 の結合も検出されていない。そのため、Rod1 はじめとするアダプタータンパク質がどのように Jen1 を認識するか (1.アダプターが直接 Jen1 を認識しているか、2. 直接認識しているとすれば、Jen1 のどの領域を認識しているか、3. その認識はグルコースシグナル伝達系に依存しているか)、という課題が存在する。本研究は、このような問題にアプローチすることで、Jen1 のグルコース不活性化における選択的な分解制御機構の解明を目指すこととした。

Table 1 Key endocytic proteins in yeast

Steps of Clathrin-mediated endocytosis	Proteins
Early protein	Ede1 Syp1 Hrr25
Early coat	Clathrin AP-2 complex Yap1801 Yap1802 Pal1
Mid coat	Sla2 Ent1 Ent2
Late coat	Pan1 End3 Sla1 Lsb3 Lsb4 Ubx3 Lab5 Gts1
WASp and myosin	Las17 Bzz1 Scd5 Vrp1 Ldb17 Myo3 Myo5 Bbc1 Ubp7 Aim21
Actin	Arp2/3 Act1 Abp1 Twf1 Scp1 Sac6 Abp140 Aim3 Cap1-Cap2 Ark1 Prk1 Cof1 Aip1 Inp52
Scission	Rvs161-Rvs167 Vps1

Bold: ubiquitin binding protein

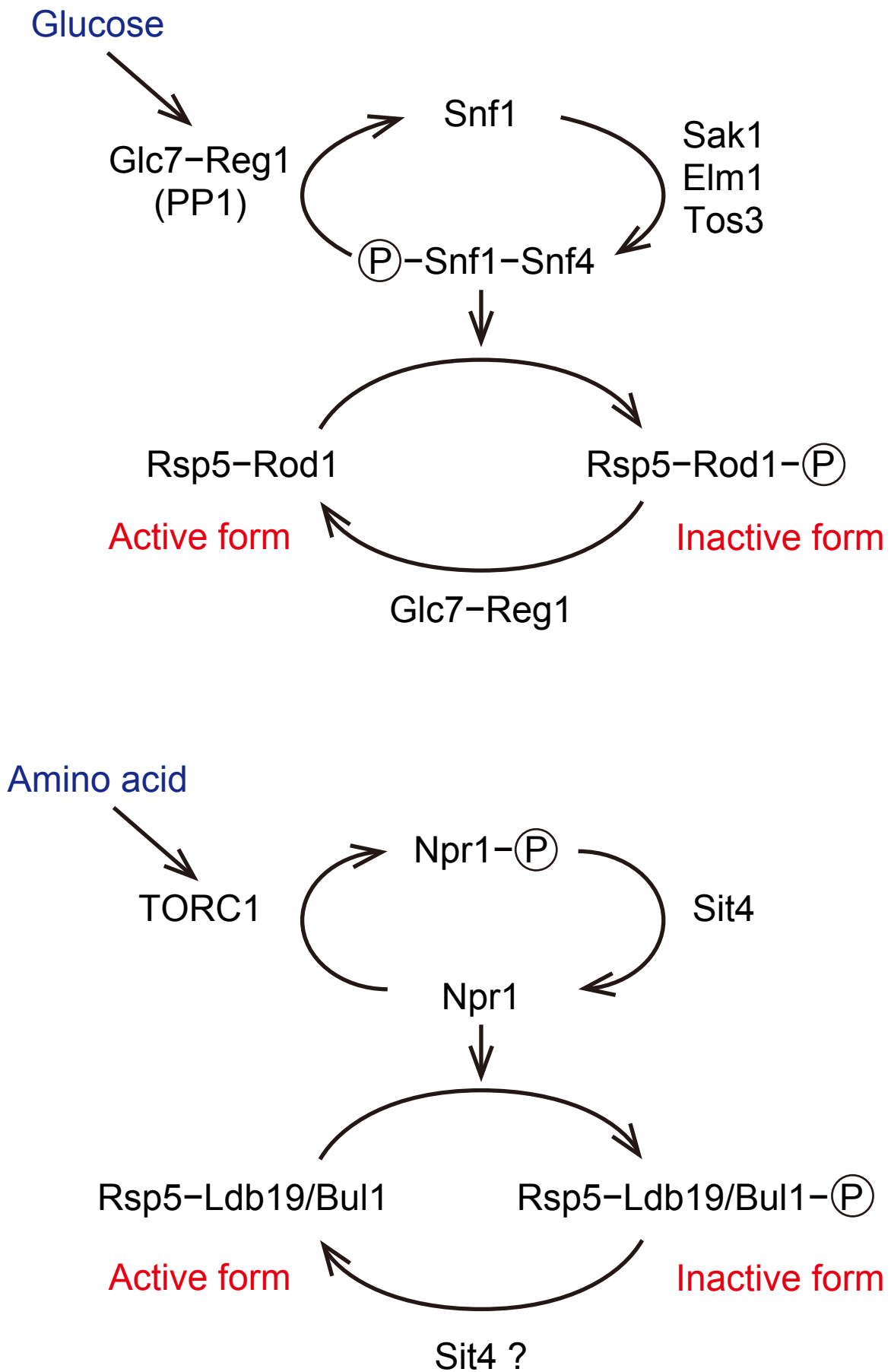


FIGURE 1. A model pathway for controlling the cycling of adapter protein (Rod1, Ldb19, and Bul1) between a phosphorylated inactive state and a dephosphorylated active state.

第一章

Jen1 のグルコース依存的な分解におけるアダプタータンパク質認識領域の同定

1. 緒言

原形質膜を通した栄養源の輸送は、細胞への栄養供給の最初のステップである。そのため、細胞内の需要や外界環境の急激な変化に応じて、原形質膜上の輸送体のライナナップは厳密に制御されている。また、シグナルの伝達や毒性物質の排出など、刻々と変化する細胞内外の環境に対しても同様に、細胞は原形質膜を常に最適な状態にチューニングすることで適応している。一般的に、出芽酵母の輸送体のエンドサイトーシスは、アダプタータンパク質を介した HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるユビキチン化が引き金となり起こる。近年、Rsp5 は細胞内に存在する 14 個の α -アレスチンを介して輸送体のユビキチン化を行っていることが明らかとなってきた (Lin *et al.*, 2008; Nikko and Pelham, 2009; Merhi and André, 2012; Novoselova *et al.*, 2012; Aubry and Klein, 2013)。また、出芽酵母はそれらのアダプタータンパク質を使い分けることで状況に応じて選択的に輸送体の分解を行っていることも示唆されている。例えば、イノシトール輸送体 Irt1 は、イノシトール欠乏状況下で、細胞外からイノシトールを補填させるため、原形質膜上に局在している。その一方で、外界環境のイノシトール濃度の上昇により、原形質膜上から除去される。近年、この Irt1 の分解は ART ファミリーの 1 つである Art5 依存的に制御されていることが明らかとなっており、Art5 以外のアダプターが欠損してもその分解は抑制されないことが示されている (Nikko and Pelham, 2009)。さらには、同じ輸送体でも異なる環境下でアダプタータンパク質が使い分けられていることが明らかとなってきた。例えば、高親和型リシン輸送体 Lyp1 は、培地中の高濃度のリシンまたは転写阻害剤シクロヘキシミドの添加によって細胞膜上から取り込まれ分解され、前者では Ldb19 (Art1)が、後者では Ecm21 (Art2)が Rsp5 のアダプターとして機能していることが知られている (Lin *et al.*, 2008; Nikko and Pelham, 2009)。

これまで、マンガン輸送体 Smf1 やメチオニン輸送体 Mup1、高親和性グルコース輸送体 Hxt6 においては、それぞれの分解シグナルに応じてアダプタータンパク質との直接的な相互作用(Smf1-Ecm21、Mup1-Ldb19、Hxt6-Rod1、Hxt6-Crs2 (Art8))が示されている (Lin *et al.*, 2008; Nikko *et al.*, 2008; Llopis-Torregrosa *et al.*, 2016; Hovsepian *et al.*, 2017)。さらに、Mup1 ではアダプターとの結合に Mup1 の N 末端領域や輸送体のコアドメインの一部が必要であることが明らかにされている (Guiney *et al.*, 2016)。しかし、Mup1 と Ldb19 のように直接的な相互作用やその領域が明らかとされた例は乏しく、輸送体の分解における認識領域やその認識機構には不明な点が多い。そこで、本研究では Jen1 のグルコース依存的な分解において、まずアダプタータンパク質による Jen1 認識領域の解析を試みることにした。これまでに、Becuwe らの報告や、同時期に実施された当研究室の大橋による出芽酵母の遺伝子ライブラリーを用いたスクリーニングから、 α -アレスチン *ROD1/ART4* 遺伝子破壊株がグルコース依存的な Jen1 分解の遅延

株として見出されている (Fig. 2、大橋 2010、Becuwe *et al.*, 2012)。また、当研究室の葛西により、Rod1 以外にも Bul1、Bul2 が関与していることが示唆されていたことから (葛西、2011)、本章ではグルコースシグナルに応答した Jen1 分解において、これらアダプターとして機能する Rod1、Bul1/2 の Jen1 認識領域の探索を試みた。

2. 実験材料および方法

2-1 使用菌株

本研究では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 を親株として用いた。また、単独遺伝子破壊株は市販の Yeast MAT α collection (Open Biosystems)から得た。使用菌株は Table 2 に示した。

2-2 使用試薬

特に表記のない限り、和光純薬㈱の特級試薬を適宜オートクレーブ処理もしくはフィルター (Millipore, Millex® Syringe-driven Filter Unit)滅菌処理して用いた。各種制限酵素、修飾酵素はタカラバイオ、ロシュ・ダイアグノティクス、ニッポンジーン、ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパンのものを適宜用い、添付のプロトコルに従って反応させた。本研究で使用したオリゴヌクレオチド (Table 3)はユーロフィンジェノミクスでカスタム合成された。

2-3 培地

大腸菌の生育には、Luria Broth (LB)培地 (1.0% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl)、2×YT 培地 (1.6% Bacto tryptone, 1% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl)を用い、必要に応じて 50 μ g/mL のアンピシリンを加えた。LB 寒天培地は上記 LB 培地に寒天を 1.5%となるように加えて作製した。

酵母の生育には、以下の培地を用いた。寒天培地は寒天を 2%となるように加えて作製した。

- (1) YPD 培地; 1% Bacto yeast extract, 2% polypepton, 2% glucose (必要に応じて、100 μ g/mL clon NAT (nourseothricin)を加えた)
- (2) synthetic complete (SC)培地; 0.17% FORMEDIUM™ yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, 0.5% casamino acid, 2% glucose, 0.002% Ura, 0.002% Ade, 0.002% Trp
- (3) SC-Ura 培地; 0.17% FORMEDIUM™ yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, 0.5% casamino acid, 2% glucose, 0.002% Ade, 0.002% Trp
- (4) SC-Leu 培地; 0.17% FORMEDIUM™ yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, amino acids (0.002% Arg, 0.010% Asp, 0.010% Glu, 0.008% Ile, 0.012% Lys, 0.002% Met, 0.005% Phe, 0.040% Ser, 0.020% Thr, 0.006% Tyr, 0.015% Val), 0.002% His, 0.002% Trp), 0.002% Ura, 0.002% Ade, 2% glucose
- (5) SC-His 培地; 0.17% FORMEDIUM™ yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium

- sulfate, 0.5% ammonium sulfate, amino acids (0.002% Arg, 0.010% Asp, 0.010% Glu, 0.008% Ile, 0.012% Lys, 0.002% Met, 0.005% Phe, 0.040% Ser, 0.020% Thr, 0.006% Tyr, 0.015% Val), 0.002% Leu, 0.002% Trp), 0.002% Ura, 0.002% Ade, 2% glucose
- (6) SC-Ura/Leu 培地; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, amino acids (0.002% Arg, 0.010% Asp, 0.010% Glu, 0.008% Ile, 0.012% Lys, 0.002% Met, 0.005% Phe, 0.040% Ser, 0.020% Thr, 0.006% Tyr, 0.015% Val, 0.002% Trp), 0.002% Ade, 2% glucose
- (7) SLac 培地; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, 0.5% casamino acid, 0.5% DL-lactate, 0.002% Ura, 0.002% Ade, 0.002% Trp
- (8) SLac-Ura 培地; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, 0.5% casamino acid, 0.5% DL-lactate, 0.002% Ade, 0.002% Trp
- (9) SLac-Ura/Leu 培地; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, amino acids (0.002% Arg, 0.010% Asp, 0.010% Glu, 0.008% Ile, 0.012% Lys, 0.002% Met, 0.005% Phe, 0.040% Ser, 0.020% Thr, 0.006% Tyr, 0.015% Val, 0.002% His, 0.002% Trp), 0.5% DL-lactate, 0.002% Ade
- (10) SGE-Ura; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, 0.5% casamino acid, 0.002% Ade, 0.002% Trp, 2% glycerol, 3% ethanol

2-4 大腸菌の形質転換

DNA の ク ロ ー ニ ン グ に は 大 腸 菌 DH5 α (F⁻, Φ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*)株を用いた。大腸菌のコンピテントセルの作製および形質転換操作は Inoue らの方法を参考に行った (Inoue *et al.*, 1990)。すなわち、-80°C で保存していた大腸菌のコンピテントセル 50 μ L (5.0~7.5 OD₆₀₀/mL)を氷上で融解し、DNA 溶液を適当量加えた。氷上に 30 分間静置し、42°C でのヒートショックを 30 秒間行った。氷上で 2 分間急冷後、菌液を LB+amp プレートに塗布し、37°C で約 12 時間培養した。

2-5 アルカリ-SDS 法によるプラスミド DNA の調製

大腸菌の形質転換株のコロニーを爪楊枝でかき取り、2 mL の 2 \times YT+amp 培地に植菌し、37°C で約 12 時間振盪培養した。培養後、1.5 mL の培養液を 1.5 mL サンプルチューブに移し 20,400 $\times g$ で 1 分間遠心し、上清を除去した。氷上で、菌体を 100 μ L の Solution I (25 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM EDTA、50 mM グルコース) に懸濁した。次に 200 μ L の Solution II (0.2 N NaOH、1% SDS) を加え穏やかに混ぜ、氷上に 3 分間

静置した。その後、150 μ L の Solution III (3M 酢酸カリウム、11.5% 氷酢酸) を加えて激しく攪拌してから、150 μ L の 10 M 酢酸アンモニウムを加えてよく混ぜた。この溶液を 4°C において 20,400 $\times g$ で 5 分間遠心した後、上清 600 μ L を新しい 1.5 mL サンプルチューブに移した。これに 600 μ L のイソプロパノールを加え、軽く攪拌した後に氷上にて 15 分間静置した。その後、再び 4°C において 20,400 $\times g$ で 5 分間遠心した。遠心後、上清を除き 80%エタノールを 1 mL 加え軽く攪拌した後に 20,400 $\times g$ で 5 分間遠心した。遠心後、上清を完全に取り除き、沈殿を乾燥させた。この沈殿物を 20 μ L/mL の RNase A を含む 100 μ L の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に溶解させプラスミド DNA 溶液とした。

2-6 酵母の形質転換

2-6-1 出芽酵母の高効率形質転換法 (Amberg *et al.*, 2005)

YPD プレートで 2 日間生育させた菌株を 5 mL の YPD 培地に植菌し 30°C で一晚培養した。一晚培養液の菌体密度を測定し、5 mL の YPD 培地に $OD_{600} = 0.4$ になるように希釈し、 $OD_{600} = 1.0 \sim 1.5$ となるまで 30°C で培養した。その後、培養液を 15 mL コニカルチューブに移し、600 $\times g$ で 2 分間遠心して菌体を回収した。培養上清を捨て、1 mL の滅菌水に懸濁の後、1.5 mL サンプルチューブに移し、2,300 $\times g$ で 1 分間遠心し再び集菌を行った。滅菌水を取り除いた後、240 μ L の 50% PEG4000 (Sigma-Aldrich)、36 μ L の 1 M 酢酸リチウム、25 μ L の 2 mg/mL サケ精子 DNA (和光純薬)、DNA 断片を菌体に加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌し形質転換溶液とした。サケ精子 DNA は使用前に 5 分間ボイルし、水中で急冷してから使用した。反応溶液を 30°C で 30 分間インキュベートさせた後、42°C で 20 分間ヒートショックさせた。反応後、形質転換溶液を 2,300 $\times g$ で 1 分間遠心し、上清を除いた。菌体を滅菌水に懸濁し、選択培地に塗布して 30°C で 2~3 日培養した。生育してきたコロニーを再び新しい選択培地に植菌し、形質転換体とした。

2-6-2 プラスミドによる酵母の形質転換

本方法は、高形質転換効率が必要ないとき (例えば、完成したプラスミドを導入する場合) に用いられた。形質転換の反応数に応じて形質転換溶液の量を調整した。例として、5 回分の形質転換を行ったときの方法を示した。

酵母細胞を 5 mL の YPD 培地で一晚培養し、前培養液とした。前培養液の菌体密度を測定し 5 mL の YPD 培地に $OD_{600} = 0.4$ になるように植菌し、 $OD_{600} = 1.0 \sim 1.5$ となるまで 30°C で培養した。その後、培養液を 15 mL コニカルチューブに移し、600 $\times g$ で 2 分間遠心して菌体を回収した。培養上清を捨て、1 mL の滅菌水に懸濁した後、1.5 mL サンプルチューブに移し、2,300 $\times g$ で 1 分間遠心し再び集菌を行った。滅菌水を取り除いた後、400 μ L の 50% PEG4000、100 μ L の 5 \times TELiAc (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、

5 mM EDTA、0.5 M 酢酸リチウム)、25 μ L の 2 mg/mL サケ精子 DNA を加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌した。サケ精子 DNA は使用前に 5 分間煮沸し、氷中で急冷した後に使用した。この細胞懸濁液を 105 μ L ずつ新しいチューブに分注し、0.5 μ L のプラスミド DNA を加えてよく攪拌した。この溶液を 30°C で 30 分間インキュベートさせた後、42°C で 20 分間ヒートショックさせた。2,300 $\times g$ で 1 分間遠心し、上清を除いた後、菌体を滅菌水に懸濁し、適切な選択培地に塗布して 30°C で 2~3 日培養した。生育してきたコロニーを再び新しい選択培地に植菌し、形質転換体とした。

2-7 酵母 DNA の調製

2-7-1 酵母ゲノム DNA の調製

酵母細胞を YPD または SC 選択培地で一晚培養した。5 mL の一晚培養液を 15 mL 容コニカルチューブに移し、600 $\times g$ で 2 分間遠心し細胞ペレットを得た。これを 0.2 mL の lysis buffer (2% Triton X-100、1% SDS、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に懸濁した。さらに 0.2 mL のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) とオートクレーブ処理した 0.3 g のガラスビーズ (ϕ 0.5 mm) を加えて 3 分間ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。その後 0.2 mL の TE を加え 5 分間 20,400 $\times g$ で遠心した。遠心後、水層を新しい 1.5 mL チューブに移した。そこへ 1 mL の -20°C に冷却した 100 % エタノールを加え、軽く攪拌した後に 20,400 $\times g$ で 5 分間遠心した。遠心分離後、上清を取り除いた沈殿に 80 % エタノールを加え、再び 20,400 $\times g$ で 5 分間遠心した。遠心後、上清を完全に取り除き、沈殿を乾燥させた。その後、20 μ L/mL の RNase A を含む 500 μ L の TE に溶かした。

2-7-2 酵母プラスミド DNA の抽出・調製

酵母細胞を SC 選択培地で一晚培養した。1.5 mL の一晚培養液を 1.5 mL 容サンプルチューブに移し、2,300 $\times g$ で 1 分間遠心し細胞ペレットを得た。これを 0.2 mL の lysis buffer (2% Triton X-100、1% SDS、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に懸濁した。さらに 0.2 mL のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) とオートクレーブ処理した 0.3 g のガラスビーズ (ϕ 0.5 mm) を加えて 3 分間ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。その後 5 分間 20,400 $\times g$ で遠心し、水層を新しい 1.5 mL チューブに移した。この酵母 DNA 溶液を GENECLAN Kit (Q-Biogene) を用いて精製し、10 μ L の TE で溶出した。この 1 μ L を大腸菌の形質転換に用い、得られた形質転換体からプラスミド DNA を調製した。

2-8 プラスミド DNA の作製

本章で使用したプラスミドは Table 4 に記載した。プラスミドベクターへの DNA のクローニングには、ライゲーション反応またはギャップ・リペア・クローニング (GRC) 法 (Oldenburg *et al.*, 1997)を用いた。また、Jen1 や Rod1 の部位特異的変異体や部分欠損変異体を発現するプラスミド DNA は特に表記がない限り GRC 法によって作製しており、DNA のクローニングに用いた鋳型 DNA やオリゴヌクレオチドプライマー、およびベクターの組み合わせは Table 5 に記載した。

2-8-1 ライゲーション反応によるプラスミド DNA の作製

PCR 産物またはプラスミド DNA から制限酵素処理により目的の DNA 断片を切り出し、インサート DNA とした。ベクターはプラスミド DNA を適切な制限酵素で消化したものを使用した。それぞれ、制限酵素処理後にアガロースゲル電気泳動に供し、目的断片をアガロースゲルから切り出した後、GENECLEAN Kit (Q-Biogene)を用いて DNA 断片を精製した。両者のモル比が 3 : 1 (インサート : ベクター) になるように混合した DNA 溶液に、DNA Ligation Kit< Mighty Mix > (タカラバイオ) の Ligation Mix 液を等量加え 16°C で 30 分間反応させた。この反応液 5.0 μ L を大腸菌の形質転換に用い、得られた形質転換体からプラスミド DNA を調製した。

2-8-2 GRC 法によるプラスミド DNA の作製

GRC 法は出芽酵母の高い相同組換え効率を利用して、酵母細胞内でベクター DNA とインサート DNA を連結させるクローニング法である。インサート DNA と線状化されたベクター DNA の末端付近に 15 bp 程度の相同領域があると、その領域で組換えが起こり、環状のプラスミド DNA が得られる。DNA 断片が複数でも、相同領域があれば、それらを連結できる。この性質を利用して、部位特異的変異を導入することができる。

インサート DNA は BY4742 株のゲノム DNA やプラスミド DNA を鋳型 DNA として PCR 反応を行うことで取得した。DNA ポリメラーゼには Q5 High-Fidelity DNA polymerase (ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン) を用い、98°C で 30 秒間反応後、98°C で 10 秒、60°C で 20 秒、72°C で X 秒 (X=30 秒 \times 1 kb) を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 2 分間反応させ、それぞれ変異を導入する領域の上流側と下流側の DNA 断片を作製した。

Template DNA	0.5 μ L
10 μ M Forward primer	1.0 μ L
10 μ M Reverse primer	1.0 μ L
5 x Q5 buffer	4.0 μ L
2.5 mM dNTP mix	1.6 μ L
Q5 High-Fidelity DNA polymerase	0.2 μ L
滅菌水	11.7 μ L
total	20.0 μ L

また、ベクターとして、酵母内で自己複製できるプラスミドを用いた。プラスミド

DNA を適切な制限酵素で消化し、線状化したものを使用した。それぞれの DNA 断片は、アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Kit (Q-Biogene)または FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス)を用いて精製した後に、2種類のインサート DNA とベクターDNA を重量比 50: 1 の割合で混合し、酵母の高頻度相同組換えによる形質転換に用いた。

2-8-3 pRS316-Jen1-GFP (pSF3)の作製

野生型の酵母ゲノム DNA を鋳型 DNA としてオリゴヌクレオチド ST13 と ST25 を用いて *JEN1* 領域をコードする DNA 断片を得た。この DNA 断片と pRS316-GFP-ADH1t を *SacI* と *EcoRI* で消化し、ライゲーションすることにより pRS316-Jen1-GFP を作製した。

2-8-4 pRS316-GFP-Jen1 (pSF57)の作製

野生型の酵母ゲノム DNA を鋳型 DNA としてオリゴヌクレオチド DS16-r と ST25 を用いて *JEN1* のプロモーター領域をコードする DNA 断片を得た。得られた DNA 断片は *SpeI* と *BamHI* で消化した。さらに、野生型の酵母ゲノム DNA を鋳型 DNA としてオリゴヌクレオチド DS15 と DS16 を用いて *JEN1* 領域とそのターミネーター領域をコードする断片を得た。この DNA 断片は *BamHI* と *EcoRI* で消化した。これら DNA 断片は、*SpeI* と *EcoRI* で消化した pRS316 にライゲーションすることにより、*JEN1* 遺伝子のプロモーター領域と ORF 領域に *BamHI* 認識配列が挿入された pRS316-*JEN1*p-*BamHI*-*JEN1*-*JEN1*t を作製した。次に、GFP カセットから両末端を *BamHI* で消化することで切りだした GFP 断片を *BamHI* で消化したプラスミド pRS316-*JEN1*p-*BamHI*-*JEN1*-*JEN1*t にライゲーションすることにより、pRS316-GFP-Jen1 を作製した。

2-9 *rod1Δ jen1Δ*二重破壊株、*bul1Δ bul2Δ jen1Δ*三重破壊株、*rod1Δ bul1Δ bul2Δ jen1Δ*四重破壊株の作製

JEN1 遺伝子置換破壊には *Schizosaccharomyces pombe* の *his5⁺*遺伝子 (pUG27, (Gueldener *et al.*, 2002))または nourseothricin 薬剤耐性 *natNT2* 遺伝子 (*pFA6a-natNT2*, (Janke *et al.*, 2004))を選択マーカーとして用いた。3'側に選択マーカーの末端と相同な塩基配列を 5'側に *JEN1* 遺伝子上流配列もしくは下流配列と相同な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーを使用し (Table 3)、pUG27 または *pFA6a-natNT2* を鋳型 DNA として、以下の反応系で PCR を行った。DNA ポリメラーゼには Ex-*Taq* DNA polymerase (タカラバイオ)を用い、95°C で 2 分間反応後、95°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で X 秒 (X=60 秒×1 kb) を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 5 分間反応させ、*JEN1* 遺伝子置換破壊用フラグメントを作製した。

plasmid DNA	0.5 μ L
10 μ M Forward primer (ST16)	2.5 μ L
10 μ M Reverse primer (ST17)	2.5 μ L
10 x Ex- <i>Taq</i> buffer	5.0 μ L
2.5 mM dNTP mix	4.0 μ L
5 U/ μ L Ex- <i>Taq</i> DNA polymerase	0.5 μ L
滅菌水	35.0 μ L
<hr/>	
total	50.0 μ L

2-6-1 に従って、上記 PCR 産物 50 μ L を用いて、*rod1 Δ* 株、HKY37 株、YTS354 株を形質転換した。形質転換体から 2-7-1 に従って、ゲノム DNA を調製し、PCR 法によって *JEN1* 遺伝子の置換破壊の確認を行った。PCR の反応条件は以下の通りである。

genomic DNA	0.5 μ L
10 μ M Forward primer (SHO69)	0.5 μ L
10 μ M Reverse primer (oTAKA104)	0.5 μ L
10 x Ex- <i>Taq</i> buffer	1.0 μ L
2.5 mM dNTP mix	0.8 μ L
5 U/ μ L Ex- <i>Taq</i> DNA polymerase	0.025 μ L
滅菌水	6.675 μ L
<hr/>	
total	10.0 μ L

95°C で 2 分間反応後、95°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で 1 分 45 秒を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 5 分間反応させた。

2-10 *rod1 Δ vrp1 Δ* 二重破壊株の作製

VRP1 遺伝子置換破壊には *Kluyveromyces lactis* の *LUE2* 遺伝子 (pUG73, (Gueldener *et al.*, 2002)) を選択マーカーとして用いた。3'側に選択マーカーの末端と相同な塩基配列を 5'側に *VRP1* 遺伝子の上流配列もしくは下流配列と相同な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーを使用し (Table 3)、pUG73 を鋳型 DNA として、以下の反応系で PCR を行った。DNA ポリメラーゼには Ex-*Taq* DNA polymerase (タカラバイオ) を用い、95°C で 2 分間反応後、95°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で 150 秒を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 5 分間反応させ、*VRP1* 遺伝子置換破壊用フラグメントを作製した。

plasmid DNA	0.5 μ L
10 μ M Forward primer (SHO201)	2.5 μ L

10 μ M Reverse primer (SHO202)	2.5 μ L
10 x Ex- <i>Taq</i> buffer	5.0 μ L
2.5 mM dNTP mix	4.0 μ L
5 U/ μ L Ex- <i>Taq</i> DNA polymerase	0.5 μ L
滅菌水	35.0 μ L
<hr/>	
total	50.0 μ L

2-6-1 に従って、上記 PCR 産物 50 μ L を用いて、*rod1* Δ 株を形質転換した。形質転換体から 2-7-1 に従って、ゲノム DNA を調製し、PCR 法によって *VRP1* 遺伝子の置換破壊の確認を行った。PCR の反応条件は以下の通りである。

genomic DNA	0.5 μ L
10 μ M Forward primer (SHO203)	0.5 μ L
10 μ M Reverse primer (KS1)	0.5 μ L
10 x Ex- <i>Taq</i> buffer	1.0 μ L
2.5 mM dNTP mix	0.8 μ L
5 U/ μ L Ex- <i>Taq</i> DNA polymerase	0.025 μ L
滅菌水	6.675 μ L
<hr/>	
total	10.0 μ L

95°C で 2 分間反応後、95°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で 1 分 45 秒を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 5 分間反応させた。

2-11 Jen1 の発現誘導

菌株を SC 選択培地に植菌し、30°C で一晚培養した。翌日、一晚培養液を OD₆₀₀ = 0.25 /mL となるように、同じ培地で希釈した。30°C で 4 時間培養した後、菌体を滅菌水にて一度洗浄し、OD₆₀₀ = 1.0 /mL となるように SLac 選択培地に懸濁した。再び 30°C で 3 時間培養し、Jen1 の発現を誘導した。その後、蛍光顕微鏡による局在観察、全細胞タンパク質の抽出に用いた。

SC および SLac 培地は行う実験によって培養スケールを変更した。また、酵母株が保持するプラスミドの選択マーカーに応じて適宜栄養源を抜いたものを使用した。

2-12 蛍光顕微鏡による GFP 融合タンパク質の局在観察 (Jen1-GFP)

Jen1-GFP 発現プラスミドを保持する菌株を用いて、2-11 に従って Jen1 の発現を誘

導した。その後、500 μ L の培養液を 1.5 mL サンプルチューブにとり $2,300 \times g$ で 1 分間遠心し、上清を約 450 μ L 除き、残りの 50 μ L の培地に菌体を懸濁したものを観察に用いた。また、グルコースを添加して Jen1 の分解を観察する場合には、SLac-Ura 培地で 3 時間培養した後、終濃度が 2% となるようにグルコースを加え、一定時間ごとにサンプリングし観察に用いた。

Jen1-GFP の局在解析はデジタルカメラ ORCA-Flash2.8 (浜松ホトニクス) および解析ソフトウェア MetaMorph (Molecular Devices) を搭載した蛍光顕微鏡 IX71 (OLYMPUS) を使用して行った。

2-13 全細胞タンパク質の抽出 (Jen1-GFP)

pJen1-GFP (変異体も含む) を保持した酵母細胞の全細胞タンパク質の抽出は TCA 法によって行った。2-11 に従って各菌株を培養し Jen1 の発現を誘導した。その後、培養液 1 mL を 1.5 mL サンプルチューブに採取し、そこへ 100 μ L の 100% (w/v) TCA 溶液を添加し、よく混和した後に氷上に 15 分間静置した。その後、 $20,400 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。沈殿した菌体を冷やした 10% (w/v) TCA 溶液を添加し、さらにガラスビーズを少量加えて 10 分間ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。その後 5 分間 $20,400 \times g$ で遠心し、上清を完全に取り除いた。そこへ TCA sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.0)、100 mM ジチオスレイトール、2% SDS、10% グリセロール、200 mM Tris (pH 調整なし)、BPB) を $1.0 \text{ OD}_{600}/50 \mu\text{L}$ となるように加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌し、沈殿を均一に懸濁させた。その後 37°C で 15 分間熱処理し SDS 化を行った。グルコースを添加して Jen1 の分解を観察する場合には、終濃度が 2% となるように 50% グルコースを適量加えた。直後に菌体濃度を測定し、一定時間ごとにサンプリングした。ウェスタンブロット法により残存 Jen1 量を解析した (以下グルコース・チェイス法と呼称する)。

2-14 免疫沈降法 (Jen1-GFP)

pJen1-GFP (変異体も含む) を保持した各菌株を 2-11 に従って 10 mL の SC-Ura 培地で培養することにより Jen1 の発現を誘導した。誘導後、終濃度が 2% となるように 50% グルコースを加えた。直後に菌体濃度を測定し、培養液はグルコース添加 10 分後に 15 mL サンプルチューブに採取した。そこへ 1 mL の 100% (w/v) TCA 溶液を添加し、よく混和した後に氷上に 15 分間静置した。その後、 $600 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。得られた TCA 沈殿物は 100 μ L の 10% (w/v) TCA 溶液で懸濁後、1.5 mL サンプルチューブへ移した。そこへガラスビーズを加え、10 分間ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。その後 $20,400 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。残った沈殿物に対して、ジチオスレイトールを除いた TCA sample buffer を $10 \text{ OD}_{600}/200 \mu\text{L}$ となるように加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌し、沈殿を均一に懸濁させた。その後

37°C で 15 分間熱処理し SDS 化を行った。得られた全細胞タンパク質は 5 分間 $20,400 \times g$ で遠心し、上清の 20 μL (1 OD₆₀₀ 相当) を新しい 1.5 mL チューブに移した。そこへ 30 μL の TCA sample buffer を添加し、さらに 37°C で 15 分間熱処理することで全細胞画分とした。一方で、残りの上清 (170 μL) を新しい 2.0 mL チューブに移し、1.8 mL の TWIP buffer (150mM 塩化ナトリウム、50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、0.5% Tween-20、0.1 mM EDTA) で希釈した。そこへ、2 μL のマウス抗 GFP 抗体 (ロシュ・ダイアグノティクス) を添加し、4°C で 2 時間穏やかに攪拌させながらインキュベートさせた。その後、30 μL の DynabeadsTM Protein G を加え再び 4°C で 1 時間穏やかに攪拌させることで抗原-抗体複合体を単離した。単離した免疫沈降物は、ビーズを TWIP buffer にて 3 度洗浄後、50 μL の TCA sample buffer に全溶出 (37°C で 15 分間熱処理) した。

2-15 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE はアクリルアミド濃度が 10% の分離ゲルを用いて行った。2-13 および 2-14 に従って調製したサンプルを 5.0 μL ずつアプライし、マーカーには Precision Plus Protein All Bule Standards (BioRad) を用いた。ゲル 1 枚あたり 20 mA の定電流で泳動先端がゲルの下端まで流れたところで泳動を止めた。

2-16 ウェスタンブロッティング

タンパク質の SDS-PAGE ゲルからの PVDF 膜への転写は、Bjerrum and Schafer-Nielsen buffer (48 mM Tris-HCl、38 mM グリシン、20%メタノール) を用いたセミドライ法で行った。なお、Jen1-GFP を検出する際には、PVDF 膜への高分子量のタンパク質の転写効率を上げるため、Transfer buffer の組成を 48 mM Tris、38 mM グリシン、10%メタノール、0.05%SDS に変更したものを使用した。転写装置にはトランスブロット SD セル (BioRad) を、PVDF 膜には Immobilon-P Transfer Membrane (メルクミリポア) を用い、2 mA/cm² の定電流で 1 時間通電した。転写後の PVDF 膜はポンソー溶液 (0.1% PONCEAU S、5%酢酸) を用いて染色することにより、タンパク質の PVDF 膜への転写を確認した。転写膜を MilliQ 水で洗浄した後、ブロッキング溶液 (0.3%スキムミルク、0.8%塩化ナトリウム、20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、0.1% Tween-20) に浸し、30 分間ゆっくり浸透した。その後、ブロッキング溶液で 2,000 倍に希釈したマウス抗 GFP 抗体 (Anti GFP, Moab(mFX75)、和光純薬) 液中に転写膜を移し、室温で一時間浸透した (一次抗体反応)。また、ローディングコントロールとして 3-Phosphoglycerate kinase (PGK) を検出するために、マウス抗 PGK 抗体 (Clone 22C5D8、Invitrogen) を 200,000 倍希釈して使用した。一次抗体反応後、TBS-T (0.8%塩化ナトリウム、20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、0.1% Tween-20) で 5 分間洗う操作を 3 回繰り返した後、ブロッキング溶液で 2 次抗体を 7,500 倍に希釈し、室温で 30 分間インキュベートすることにより 2 次抗体反応を行った。二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ標識のヤギ抗マウス IgG 抗 (BioRad) を用いた。

反応後、再び TBS-T で洗う作業を 10 分間 4 回繰り返した後、抗原の検出を行った。検出には Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (メルクミリポア) を検出試薬として用い、生じる蛍光シグナルを Image Quant Las 4000 (GE ヘルスケア・ジャパン) により検出した。

また、3FLAG-Jen1 を検出する際には、一次抗体はマウス抗 DYKDDDDK 抗体 (1E6、和光純薬) を 2,000 倍に希釈したものを用いた。

2-17 二分子蛍光相補性試験 (Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay)

本研究での二分子蛍光相補性試験 (以下 BiFC 法) は、強化型黄色蛍光タンパク質 Venus (Nagai *et al.*, 2002) を 2 分割したタンパク質 Venus N 末端断片 (VN) と Venus C 末端断片 (VC) を各タンパク質に融合させた。そして、融合タンパク質間の相互作用により成熟した Venus の蛍光シグナルは、蛍光顕微鏡 (IX71、OLYMPUS) および MetaMorph (Molecular Devices) を用いて観察した。

酵母株の培養、Jen1 の発現誘導は 2-11 に従って行った。500 μ L の培養液を 1.5 mL サンプルチューブにとり $2,300 \times g$ で 1 分間遠心した。上清を約 450 μ L 除き、残りの 50 μ L の培地に菌体を懸濁し観察に用いた。また、グルコース刺激に応答した Jen1-Rod1 間の相互作用を解析する際は、終濃度が 2% となるように 50% グルコースを適当量加えた。そして、グルコース添加 10 分後にサンプリングし観察に用いた。

2-18 フルオロピルビン酸耐性の比較

酵母株を SC-Ura 培地に植菌して 30°C で一晚培養し前培養液とした。翌日、前培養液の菌体密度を測定し、菌体を滅菌水にて一度洗浄した後に $OD_{600} = 0.1/\text{mL}$ となるように SGE-Ura 培地に植菌し、30°C で一晚培養した。翌日、 $OD_{600} = 1.0 \sim 2.0$ となったら $1.0 OD_{600}$ 相当の菌体を 1.5 mL サンプルチューブに取り、 $2,300 \times g$ で 1 分間遠心し上清を取り除いた。そこへ 200 μ L の滅菌水を加え懸濁した。ここから 10 μ L 取り、90 μ L の滅菌水に懸濁することによって 10 倍の希釈液を調製した。同様の操作を繰り返し、100 倍、1,000 倍、10,000 倍、100,000 倍の希釈液を調製し、それぞれの細胞懸濁液から 10 μ L をとり、終濃度 1.0 mM または 10 mM のフルオロピルビン酸を含む SGE-Ura プレートにスポットし、30°C で 4 日間培養した。

Table 2 Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
BY4742	<i>MATα</i> ; <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> (1)
<i>jen1Δ</i>	BY4742; <i>jen1Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
<i>rod1Δ</i>	BY4742; <i>rod1Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
<i>vrp1Δ</i>	BY4742; <i>vrp1Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
HKY37	BY4742; <i>bul1Δ::LEU2</i> <i>bul2Δ::KanMX</i> <i>jen1Δ::his5⁺</i>	Laboratory stock
YTS354	BY4742; <i>bul1Δ::LEU2</i> <i>bul2Δ::KanMX</i> <i>rod1Δ::his5⁺</i>	Laboratory stock
YSF10	BY4742; <i>rod1Δ::KanMX</i> <i>jen1Δ::natNT2</i>	This study
YSF11	BY4742; <i>bul1Δ::LEU2</i> <i>bul2Δ::KanMX</i> <i>jen1Δ::his5⁺</i>	This study
YSF12	BY4742; <i>bul1Δ::LEU2</i> <i>bul2Δ::KanMX</i> <i>rod1Δ::his5⁺</i> <i>jen1Δ::natNT2</i>	This study
YSF22	BY4742; <i>vrp1Δ::KanMX</i> <i>rod1Δ::LEU2</i>	This study

Table 3 Oligonucleotides used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
ST13	AAAAGGGATCCAACGGTCTCAATATGCTCC
ST16	AAGTTTTTCCTCAAAGAGATTAAATACTGCTACTGAAAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC
ST17	ATAGAGAAGCGAACACGCCCTAGAGAGCAATGAAAAGTGAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
ST25	TAGAGCCCAAGAAGTAGTAGCCGACAAACG
DS3	CGTGGATGTGCATATTTTCAGTAGCAGTATTT
DS4	TGAAAATATGCACATCCACGAGTTTTCTTGG
DS8	TACTGAATTCGTTTATATATTTCTTCATAACA
DS9	TATATAAACGAATTCAGTAAAGGAGAAGA
DS15	GGAGAGCGAATTCTTACCAATTTGCTGTTTCGAC
DS16	CTGCTACTGAAAATATGGGATCCTCGTCGTCAATTACAGATG
DS16-r	CATCTGTAATTGACGACGAGGATCCCATATTTTCAGTAGCAG
KS1	AGTTATCCTTGGATTTGG
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 Rv	CAGGAAACAGCTATGAC
oTAKA104	GGATGTATGGGCTAAATG
oTAKA256	GATCCGGCGGTGGTGGCTCTGGTGGAGGCGGTTCTATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCAC
oTAKA258	AGCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGTTATTTGTACAATTCATCCATACCATG
oTAKA259	AGCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGTTATTCAATGTTGTGTCTAATTTTGAAG
oTAKA257	GATCCGGCGGTGGTGGCTCTGGTGGAGGCGGTTCTACTGCTGACAAACAAAAGAATGG
SHO53	CCACCAGAGCCACCACCGCCGGATCCACCGCCACCTGAGCGATCCCGTTTTGTGA
SHO57	GCCTCCACCAGAGCCACCACCGCCGGATCCACCGCCACCAACGGTCTCAATATGCTCCT
SHO59	GCTACTGAAAATATGAAGCCAAACCTAAGCGCTGC

Table 3 Continued

Primer name	Primer sequence (5'→3')
SHO60	GGTTTGGCTTCATATTTTCAGTAGCAGTATTTAAT
SHO62	TCAGTGAAGATGATTGATTCGGGATCCCCGGGCT
SHO62-r	AGCCCGGGGGATCCCGAATCAATCATCTTCACTGA
SHO63	GACATTGTTGAACAAAAGACGGGATCCCCGGGCT
SHO63-r	AGCCCGGGGGATCCCGTCTTTTGTTCACAATGTC
SHO64	GAATACGAAGCCGATGGTCTTGGATCCCCGGGCT
SHO64-r	AGCCCGGGGGATCCAAGACCATCGGCTTCGTATTC
SHO67	CACCGCCGGATCCACCGCCACCGTTTATATATTTCTTCATAACAGGAGA
SHO69	AAATTATTTTTTTTGTCTGGTAGCAAAATCAACTCA
SHO152	GTTTCGAACTAGTATGTTTTTCATCATCATCTCGAC
SHO162	TCTCAAAGACATACGCGGCGCATATTGAGACC
SHO163	GGTCTCAATATGCGCCGCGTATGTCTTTGAGA
SHO178	GAGGAGGCCGCGGCGACCGTTGGATCCCC
SHO179	ACGGTCGCCGCGGCCTCCTCATATGTCTTTGAGAC
SHO180	TGAGGAGCATATCGCGACCGTTGGATCCCC
SHO181	CGGTCGCGATATGCTCCTCATATGTCTTTGA
SHO182	CATATGAGGAGGCCGCGGAGACCGTTGGATCCCC
SHO183	CTCCGCGGCCTCCTCATATGTCTTTGAGACGTTG
SHO193	TATGAGGAGCATGCTGAGACCGTTGGATCC
SHO194	GGTCTCAGCATGCTCCTCATATGTCTTTGA
SHO195	ATATGAGGAGGCAATTGAGACCGTTGGATCC
SHO196	TCTCAATTGCCTCCTCATATGTCTTTGAGAC

Table 3 Continued

Primer name	Primer sequence (5'→3')
SHO197	GCATATTGAGGCCGCGGGATCCCCCGGG
SHO198	TCCCGCGGCCTCAATATGCTCCTCATATGTC
SHO201	AGCCTACCATATATATAACGAATTGTTGAACAGCTGAAGCTTCGTACGC
SHO202	TGATTTATTGTAACCATGGAGAAATGCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
SHO203	CGAAGTCTGGCAAGTCGGAT
SHO255	GAGGAGgccgcggcGACCGTTTAATCACTTTTCATTG
YT21	GGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCGTGGATGGACCCCCACGC
YT22	GTCGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCCATATTTTCAGTAGCAGTATTTAAT
YT23	AAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGGGGATCCTAGGCTCGTCGTCAATTACAGATG
YT24	GACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTTCGGCAAAGCCCGGT

Table 4 Plasmids used in this study

Plasmid name	Genotype	Reference or source
pRS316	<i>CEN, URA3</i>	Sikorski and Hieter (2)
pRS316-GFP-ADHt	<i>CEN, URA3, GFP-T_{ADH1}</i>	Laboratory stock
P415GPD	<i>CEN, LEU2, P_{TDH3}-T_{CYC1}</i>	Mumberg et al. (3)
pCu416CUP1	<i>CEN, URA3, P_{CUP1}-T_{CYC1}</i>	Labbe and Thiele (4)
pKT90	<i>CEN, his5⁺, yE_{Venus}</i>	Sheff and Thorn (5)
pRS416- <i>JEN1</i> -4HA	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-JEN1-GFP</i>	Laboratory stock
pSF3	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-JEN1-GFP</i>	This study
pSF5	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ2-94)-GFP</i>	This study
pDS1	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ2-114)-GFP</i>	This study
pDS2	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ574-616)-GFP</i>	This study
pSF8	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ584-616)-GFP</i>	This study
pSF10	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ594-616)-GFP</i>	This study
pSF12	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ604-616)-GFP</i>	This study
pSF16	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ2-94, 574-616)-GFP</i>	This study
pSF18	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ2-94, H612A,I613A,E614A)-GFP</i>	This study
pSF26	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-JEN1-VN</i>	This study
pSF27	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ2-94)-VN</i>	This study
pSF28	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1(Δ574-616)-VN</i>	This study
pSF34	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-E610,E611A-GFP</i>	This study
pSF35	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-H612A,I613A,E614A-GFP</i>	This study
pSF37	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-T615A,V616A-GFP</i>	This study
pSF38	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-H612A,I613A-GFP</i>	This study
pSF40	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-H612A-GFP</i>	This study

Table 4 Continued

Plasmid name	Genotype	Reference or source
pSF41	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-I613A-GFP</i>	This study
pSF42	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-E614A-GFP</i>	This study
pSF49	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-H612A,I613A,E614A-VN</i>	This study
pSF57	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-GFP-JEN1</i>	This study
pSF58	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-GFP-jen1-H612A,I613A,E614A</i>	This study
pYT1	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-3FLAG-JEN1</i>	This study
pSF59	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-3FLAG-jen1-H612A,I613A,E614A</i>	This study
pSF48	<i>CEN, LEU2, P_{TDH3}-Rod1-VC</i>	This study

Table 5. DNA fragments used for in vivo assembly of plasmids.

Plasmid		PCR product used for in vivo assembly			Plasmid used for in vivo assembly
		Forward primer	Rivese primer	Template DNA	
pJen1(Δ 2-94)-GFP (pSF5)	Fragment 1	M13 Fw	SHO60	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO59	M13 Rv	pSF3	
pJen1(Δ 2-114)-GFP (pDS1)	Fragment 1	M13 Fw	DS3	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	DS4	M13 Rv	pSF3	
pJen1(Δ 574-616)-GFP (pDS2)	Fragment 1	M13 Fw	DS8	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	DS9	M13 Rv	pSF3	
pJen1(Δ 584-616)-GFP (pSF8)	Fragment 1	M13 Fw	SHO64-r	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO64	M13 Rv	pSF3	
pJen1(Δ 594-616)-GFP (pSF10)	Fragment 1	M13 Fw	SHO63-r	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO63	M13 Rv	pSF3	
pJen1(Δ 604-616)-GFP (pSF12)	Fragment 1	M13 Fw	SHO62-r	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO62	M13 Rv	pSF3	
pJen1(Δ 2-94, 594-616)-GFP (pSF16)	Fragment 1	M13 Fw	SHO60	pDS2	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO59	M13 Rv	pDS2	
pJen1(Δ 2-94, H612A,I613A,E614A)-GFP (pSF18)	Fragment 1	M13 Fw	SHO179	pSF5	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO178	M13 Rv	pSF5	
pJen1(E610A,E611A)-GFP (pSF34)	Fragment 1	M13 Fw	SHO163	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO162	M13 Rv	pSF3	
pJen1(H612A,I613A,E614A)-GFP (pSF35)	Fragment 1	M13 Fw	SHO179	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO178	M13 Rv	pSF3	
pJen1(T615A,V616A)-GFP (pSF37)	Fragment 1	M13 Fw	SHO198	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO197	M13 Rv	pSF3	
pJen1(H612A,I613A)-GFP (pSF38)	Fragment 1	M13 Fw	SHO183	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO182	M13 Rv	pSF3	
pJen1(H612A)-GFP (pSF40)	Fragment 1	M13 Fw	SHO196	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO195	M13 Rv	pSF3	
pJen1(I613A)-GFP (pSF41)	Fragment 1	M13 Fw	SHO194	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO193	M13 Rv	pSF3	

Table 5 Continued

Plasmid		PCR product used for in vivo assembly			Plasmid used for in vivo assembly
		Forward primer	Reverse primer	Template DNA	
pJen1(E614A)-GFP (pSF42)	Fragment 1	M13 Fw	SHO181	pSF3	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO180	M13 Rv	pSF3	
pJEN1p-GFP-Jen1(H612A,I613A,E614A) (pSF58)	Fragment 1	M13 Fw	SHO179	pSF57	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO225	M13 Rv	pSF57	
pJEN1p-3FLAG-Jen1 (pYT1)	Fragment 1	YT21	YT22	genomic DNA	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	YT23	YT24	genomic DNA	
pJEN1p-3FLAG-Jen1(H612A,I613A,E614A) (pSF59)	Fragment 1	M13 Fw	SHO179	pYT1	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-digested pRS316
	Fragment 2	SHO255	M13 Rv	pYT1	
pJen1-VN (pSF26)	Fragment 1	M13 Fw	SHO57	pSF3	<i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI-digested pCu416CUP1
	Fragment 2	oTAKA256	oTAKA259	pKT90	
pJen1(Δ 2-94)-VN (pSF27)	Fragment 1	M13 Fw	SHO57	pSF5	<i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI-digested pCu416CUP1
	Fragment 2	oTAKA256	oTAKA259	pKT90	
pJen1(Δ 574-616)-VN (pSF28)	Fragment 1	M13 Fw	SHO67	pDS2	<i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI-digested pCu416CUP1
	Fragment 2	oTAKA256	oTAKA259	pKT90	
pJen1(H612A,I613A,E614A)-VN (pSF49)	Fragment 1	M13 Fw	SHO57	pSF35	<i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI-digested pCu416CUP1
	Fragment 2	oTAKA256	oTAKA259	pKT90	
pTDH3p-Rod1-VN (pSF48)	Fragment 1	SHO53	SHO152	genomic DNA	<i>Spe</i> I/ <i>Hind</i> III-digested p415GPD
	Fragment 2	oTAKA257	oTAKA258	pKT90	

REFERENCES

1. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132
2. Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27
3. Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-122
4. Labbe, S., and Thiele, D. J. (1999) Copper ion inducible and repressible promoter systems in yeast. *Methods Enzymol.* **306**, 145-153
5. Sheff, M. A., and Thorn, K. S. (2004) Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**, 661-670

3. 結果

JEN1 遺伝子の転写はグルコースによって厳密に制御されている (Chambers *et al.*, 2004)。グルコース存在下では、転写抑制因子 Mig1 によって *JEN1* 遺伝子の転写は抑制されており、グルコースが潤渇すると転写因子 Cat8 によってその転写が活性化される (Haurie *et al.*, 2001)。

本研究では、*JEN1* 遺伝子産物を検出するために、その C 末端に GFP や VN (3-1-x,3-2 参照) の各種タグを融合したタンパク質を発現させた。これらタンパク質をコードする DNA はセントロメア型プラスミド (低コピープラスミド) を用いて導入され、その発現は *JEN1* 遺伝子プロモーターの制御下で行われるように設計された。従って、これらのプラスミドを保有する株では、融合タンパク質は内在性の Jen1 とほぼ同様の発現様式を示すことが期待される。つまり、グルコースを含まない培地 (本研究では、乳酸を炭素源とした) で Jen1 融合タンパク質の発現が誘導され、グルコースを添加するとその合成は停止する。以下の研究では、これらのプラスミドを用い、グルコース添加後の Jen1 の分解における Rsp5 アダプタータンパク質の機能について解析した。

3-1 Rsp5 アダプタータンパク質による Jen1 認識領域の探索

3-1-1 Rsp5 アダプタータンパク質三重破壊株 (*rod1Δ bul1Δ bul2Δ*)における Jen1 の局在とターンオーバー解析

グルコース刺激により誘導される Jen1 の分解は、Jen1 のユビキチン化が引き金となり起こる。そして、この Jen1 のユビキチン修飾はユビキチンリガーゼ Rsp5 によって行われている (Paiva *et al.*, 2009)。現在、グルコース刺激に応答した Jen1 の原形質膜上からの取り込みにおいて、Rod1 がアダプタータンパク質として機能することが報告されている (Becuwe *et al.*, 2012)。しかし、当研究室の葛西により、Rod1 以外にも Bul1 と Bul2 が Jen1 のエンドサイトーシスにおけるアダプタータンパク質として機能していることが示唆されている (葛西, 2011)。そこで、Rod1 に加え Bul1 および Bul2 の遺伝子を破壊した株 (*rod1Δ bul1Δ bul2Δ jen1Δ*) を作製し、これらのアダプタータンパク質がグルコース依存的な Jen1 のターンオーバーに及ぼす影響を解析した。まず、各アダプタータンパク質の遺伝子破壊株をプラスミド pRS316-*JEN*-GFP-ADH1t を用いて形質転換させた。これらの株を SLac-Ura 培地で培養することで Jen1 の発現を誘導した。その後、グルコースを添加し、Jen1 の原形質膜上からの取り込みを蛍光顕微鏡で観察した。野生株および *bul1Δ bul2Δ* 株では、60 分後にはほぼ完全に原形質膜上の Jen1-GFP は消失していた (Figure 2A)。また、*rod1Δ* 株では Jen1-GFP の取込みは野生株と比べて遅延しており、120 分後でも僅かに原形質膜上に GFP シグナルが検出できた (Figure 2A)。これに対して、*rod1Δ bul1Δ bul2Δ* 株では、120 分後でも原形質膜上の GFP の明瞭なシグナルが検出された (Figure 2A)。次に、ウェスタンブロット法によって、Jen1 の

分解における各アダプタータンパク質の貢献度を解析した。上述した各アダプタータンパク質欠損株を用いてグルコース・チェイス法を実施し、グルコース添加後の Jen1-GFP の残存量を経時的に調べた。その結果、蛍光顕微鏡を用いた Jen1 変異体の局在観察と一致し、*rod1Δ*株においてグルコース依存的な Jen1 の分解は大幅に抑制され、さらに Bul1、Bul2 がさらに欠損した *rod1Δ bul1Δ bul2Δ*株では Jen1 の分解はほぼ抑制されることが明らかとなった (Figure 2B)。また、グルコース依存的に液胞へと輸送された Jen1-GFP は液胞内プロテアーゼにより速やかに分解されるが、GFP は液胞内プロテアーゼに対して耐性を持つため、野生株では Jen1-GFP バンドの減少とともに経時的な遊離 GFP の蓄積が認められた。その一方で、*rod1Δ*株や *rod1Δ bul1Δ bul2Δ*株では、Jen1-GFP バンドの減少が抑制されるとともに、遊離 GFP の蓄積の遅延または抑制が認められた (Figure 2B)。これらの結果から、グルコースで誘導される Jen1 のエンドサイトーシスにおいて Rod1 が主要なアダプタータンパク質として働いているものの、Bul1 および Bul2 も補助的な役割を果たしていることが明らかとなった。

3-1-2 Jen1 部分欠損変異体のグルコース刺激に応答した分解

Transmembrane hidden Markov model (TMHMM) 解析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)より、Jen1 は 12 回膜貫通ドメインを持ち、N 末端 (1-141 番目) と C 末端領域 (556-616 番目) はともに細胞質側に存在すると予測されている (Figure 3A)。この他、6 番目と 7 番目の膜貫通ドメインの間に比較的大きな細胞質領域 (317-363 番目) の存在が推定されている。しかしながら、このドメインに欠失などの大きな変異を導入すると、膜貫通ドメインの配置や膜貫通ドメイン同士の相互作用に影響を与える可能性が高いと考え、まずは Jen1 の両末端の領域を欠失させ、これらの領域が Rsp5 アダプタータンパク質によって認識されるために必要な領域であるかを検証することにした。

まず、Jen1 の N 末端または C 末端領域を欠失させたプラスミド (pRS316-*jen1*(Δ2-114)-GFP または pRS316-*jen1*(Δ574-616)-GFP; Figure 3A)を用いて、*jen1Δ*株を形質転換させた。これらの株を SLac-Ura 培地で培養することで各 Jen1 変異体の発現を誘導した。その後、グルコースを添加し Jen1 の取り込みと分解を経時的に観察した。蛍光顕微鏡を用いた Jen1 変異体の局在観察の結果、C 末端領域が欠失した Jen1 変異体では、原形質膜上からの取り込みに大きな遅延が生じていた。一方で、N 末端領域が欠失した Jen1 変異体は、Jen1 の発現を誘導すると、Jen1 変異体が小胞体に蓄積し原形質膜上への輸送が滞っていた (Figure 3B)。これまでに、膜タンパク質は N 末端や C 末端領域に小胞体から coat protein complex II (COPII) 小胞への移行シグナル (ER exit signal) となる配列を有していることが報告されている (Sevier *et al.*, 2000; Epping and Moye-Rowley, 2002; Malkus *et al.*, 2002; Heineman *et al.*, 2004)。そのため、Jen1 の両末端領域を大きく欠失させることで、原形質膜上への輸送が滞ってしまったと考えられる。この N 末端領域欠損変異体の小胞体への蓄積は、当研究室の佐藤により同じプラスミドを用いて行われたシクロヘキシミドを使用した Jen1 の分解解析にお

いても観察されている。さらに、佐藤により行われた N 末端領域上の ER exit signal の探索により、106 番目から 109 番目のアミノ酸残基からなる tyrosine motif (Y¹⁰⁶ALT) が ER exit signal として同定されている (佐藤、2012)。よって、N 末端領域が欠失した Jen1 変異体の小胞体への蓄積は、ER exit signal の一つである推定 tyrosine motif (Y¹⁰⁶ALT) が損なわれたためであると予想された。しかし、本実験は原形質膜上からの Jen1 の取り込みにおいて、Jen1 の N 末端領域の必要性の有無を検証することを目的としている。ゆえに、N 末端領域欠損変異体は正常に原形質膜上へ輸送される必要がある。そこで、tyrosine motif の近傍配列を残した変異体 (Jen1(Δ2-94); Figure 3A) の GFP 融合タンパク質を発現させ、蛍光顕微鏡を用いてその局在を観察した。SLac 培地で培養した時、Jen1(Δ2-94)-GFP は正常に原形質膜へ輸送されていた (Figures 3B)。以下、本論文では Jen1(Δ2-94)を Jen1ΔN、Jen1(Δ574-614)を Jen1ΔC と表記する。この株を用いてグルコース・チェイス解析を行ったところ、Jen1ΔC-GFP よりは劣るが Jen1ΔN-GFP の膜からの取り込みに遅延が見られた (Figure 3B)。さらに、Jen1 変異体の分解速度をウェスタンブロット法で解析した結果、N 末端、C 末端領域欠損体とも野生株と比較してグルコース添加直後の Jen1 量発現量自体に大きな差は見られないのに対して、経時的な Jen1-GFP のバンドの減衰が遅延していた (Figure 3C)。このことより、N 末端、C 末端領域欠損体では Jen1 の分解が抑制されていることが考えられた。特に、C 末端領域欠損ではより大きな分解抑制が観察された。

以上のことから、Jen1 の N 末端および C 末端領域は、グルコース刺激に応答した Jen1 の原形質膜上からの取り込みにおいて必要な領域であることが明らかとなった。そして、その取り込みでは特に C 末端領域が重要であることが示唆された。

3-1-3 Jen1 の N 末端および C 末端領域変異体のグルコース刺激に応答した分解解析

3-1-2 では、細胞質中に存在する N 末端および C 末端領域が Jen1 の原形質膜上からの取り込みに重要であることが示された。しかし、近年、いくつかの膜タンパク質において、アダプタータンパク質による認識には細胞質中に存在する末端領域のみならず、その他の領域も必要であるという報告がなされている (Shukla *et al.*, 2013; 2014; Kang *et al.*, 2015; Guiney *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2016)。そのため、Jen1 の分解においても上述の両末端以外にも必要な領域が存在する可能性が予想された。そこで、N および C 末端以外の領域が Jen1 の分解に必要なものであるか検証するため、Jen1 の両末端領域を同時に欠損させた変異体 Jen1ΔNC-GFP の発現コンストラクトを作製し、*jen1Δ* 株で発現させ解析に用いた。しかしながら、この変異体はグルコースの添加の有無に関わらず、小胞体に蓄積していた (Figure 4A)。この理由は定かではないが、Tyrosine motif (Y₁₀₆ALT)近傍配列からなる ER exit signal の三次元的な構造の維持には、少なくとも N 末端 (2-94 アミノ酸) および C 末端領域 (574-616 アミノ酸) のどちらかが必要であることを示しているのかもしれない。あるいは、この変異体は Jen1 全長の 2 割以上も欠損しているため、小胞体において適切なフォールディングがなされず、正しく原形

質膜上へ輸送されなかった可能性も考えられる。

Jen1(Δ NC)が原形質膜に輸送されなかったため、N 末端領域欠失 (Δ N)と C 末端領域上のアミノ酸置換変異 (3A 変異、後述 (3-2-4)) を持つ変異体 Jen1(Δ N, 3A)-GFP を SLac-Ura 培地で培養することで発現させたところ、正常に原形質膜上へと輸送されていた (Figures 4B)。そこで、グルコースを添加してエンドサイトーシスの観察を行ったが、Jen1(Δ N, 3A)-GFP の膜からの取り込みは著しく抑制され、ほとんどの Jen1 変異体が膜上に局在し続けた (Figures 4B)。Jen1 は 12 回膜貫通ドメインを持つと予測されることから、N 末端と C 末端領域以外にも細胞質側に存在している領域が複数存在するが、この解析結果よりアダプタータンパク質の認識には少なくとも N 末端と C 末端領域が重要な領域であることが明らかとなった。

3-1-4 Jen1 の部位特異的変異体のピルビン酸取り込み能の解析

Jen1 の N 末端や C 末端領域を部分的に欠損させることで Jen1 の構造自体が大きく変化してしまい、アダプタータンパク質による認識が阻害され分解が抑制されていることも考えられた。仮にそうであれば、Jen1 変異体の輸送体としての基質取り込み能にもその構造変化は影響を与えている可能性が考えられる。そこで、Jen1 Δ N または Jen1 Δ C を発現する *jen1 Δ* 株のフルオロピルビン酸 (ピルビン酸の毒性アナログ) に対する耐性を解析することで、これらの Jen1 部分欠損変異体の輸送体としての基質取り込み能を検証した (Akita *et al.*, 2000)。すなわち、各 Jen1 部分欠損変異体を保持した *jen1 Δ* 株をそれぞれ SGE 培地で一晚培養することで Jen1 の発現を誘導した後、0、1.0、10 mM のフルオロピルビン酸を含んだ SGE プレートに希釈した培養液をスポットしフルオロピルビン酸に対する感受性を比較した。その結果、空ベクター (pRS316) を保持した *jen1 Δ* 株は Jen1 によりフルオロピルビン酸を取り込むことができないため、高濃度のフルオロピルビン酸存在下でも耐性を示した。一方、野生型の Jen1 を発現するプラスミドを保持した株では、誘導された Jen1 がフルオロピルビン酸を取り込むため、低濃度でも生育が阻害された (Figures 5)。さらに、Jen1 Δ N または Jen1 Δ C 発現株はいずれも野生型 Jen1 発現株と同程度の感受性を示すことが明らかとなった。よって、Jen1 Δ N および Jen1 Δ C はすべて、野生型の Jen1 と同程度の基質輸送活性を保持しており、N 末端や C 末端領域を部分的に欠失しても、Jen1 の輸送活性を担うコア領域の構造は維持されていることが示唆された。このことより、Jen1 の全体構造が損なわれたことが原因で、グルコース依存的な分解が阻害された訳ではないと考えられた。

3-1-5 Rsp5 アダプター破壊株 (*rod1 Δ* および *bul1 Δ bul2 Δ*) における Jen1 部分欠損変異体のグルコース刺激に応答した分解

これまで、Jen1 の分解において、Rod1 が主なアダプターとして機能していることが知られている (Figure 2, Becuwe *et al.*, 2012)。また、3-1-1 で示したように、Rod1 以外に

も Bul1 および Bul2 も Jen1 の分解に関与していることが明らかとされた (Figure 2)。そこで、Jen1 の分解における Bul1、Bul2 の影響を排除するために、これら遺伝子の破壊株 (*bul1Δ bul2Δ jen1Δ*) を用いて、Jen1 部分欠損変異体 Jen1ΔN および Jen1ΔC の分解を解析することにした。蛍光顕微鏡を用いた解析の結果、Jen1ΔN-GFP の原形質膜上からの取り込みでは、野生株における Jen1ΔN の取り込みと同程度の分解遅延が認められた。一方で、Jen1ΔC では、著しく原形質膜上からの取り込みが抑制されており、野生型や ΔN 変異体で見られた液胞でのシグナルもほとんど認められなかった (Figure 6A)。次に、ウェスタンブロット法によりグルコース添加後の Jen1-GFP の残存量を経時的に調べた。その結果、Jen1 や Jen1ΔN は、野生株を用いたときと同程度の速度で分解されている一方で、Jen1ΔC はグルコース添加前と添加 120 分後でほとんど Jen1-GFP バンドの減衰が認められなかった (Figure 6B)。この結果は、蛍光顕微鏡を用いた Jen1 変異体の局在観察と一致するものであり、グルコースに応答して Rod1 が Jen1 を認識するためには N 末端領域も C 末端領域も重要であることが明らかとなった。また、Jen1ΔC が *bul1Δ bul2Δ* 株で極めて安定したことから、C 末端領域は細胞内への取り込みに必要な領域であることが示唆された。

さらに、*ROD1* 遺伝子破壊株 (*rod1Δ jen1Δ*) を使用することで、グルコース依存的な Jen1 分解において Jen1 の N 末端領域や C 末端領域が Rod1 以外のアダプター (主に Bul1 と Bul2) による認識に必要かどうかを検証した。蛍光顕微鏡を用いた解析の結果、Jen1ΔN 変異体では、Jen1 変異体の細胞内への取り込みや分解が大幅に抑制されていた (Figure 6C)。この Jen1ΔN の細胞内への取り込み抑制は、ウェスタンブロット法でも同様の結果が得られたことから (Figure 6D)、Rod1 以外で Jen1 を認識するアダプタータンパク質の大部分は Jen1 の N 末端領域を認識している可能性が示唆された。また、C 末端領域を欠失させた Jen1 変異体の原形質膜上からの取り込みでは野生株に発現させたものと比較して大きな遅延は見られなかった (Figure 6C)。しかしながら、ウェスタンブロット法によるグルコース添加後の Jen1-GFP の残存量を経時的に調べたところ、野生株における Jen1ΔC と比較して、*rod1Δ* 株ではさらに分解遅延が認められた (Figure 6D)。この結果は、マイナーながら Jen1 の N 末端領域も Rod1 を介した Jen1 のエンドサイトーシスに必要であること示している。

3-2 Rod1 による Jen1 認識領域の探索

3-2-1 Jen1 部分欠損変異体のグルコースに応答したユビキチン化

3-1 より、グルコース刺激に応答した Jen1 の原形質膜上からの取り込みにおいて、その N 末端と C 末端領域が重要であることが明らかとされた。膜タンパク質のエンドサイトーシスは標的のユビキチン化が引き金となり誘導される。そこで、N 末端と C 末端領域欠損変異体の分解遅延はユビキチン化が抑制されるため生じているのか検証した。一般的に、原形質膜上でユビキチン化された膜タンパク質はエンドサイトーシ

スの標的になり、細胞内へ取り込まれ分解されてしまう。しかし、エンドサイトーシスが抑制された株では、分解の標的となる原形質膜タンパク質の細胞内への取り込みが抑制されるため、ユビキチン化された膜タンパク質を検出できることが期待される。そこで、エンドサイトーシス抑制株を用い、Jen1 Δ N および Jen1 Δ C のユビキチン化の解析を試みることにした。

本実験では、エンドサイトーシス抑制株として *VRP1* 遺伝子破壊株を用いた (Munn *et al.*, 1995)。エンドサイトーシスにおける膜の陥入にはアクチン重合が必要であるが、Vrp1 はその足場となるアクチンの核形成を促進する因子である。まず、*vrp1 Δ* 株へ野生型の Jen1-GFP を SLac 培地中で発現させ、グルコース・チェイス解析によるグルコース添加後の Jen1-GFP の経時的な変化をウェスタンブロット法で調べた。その結果、グルコース添加後、経時的に Jen1-GFP の PAGE における移動度が小さくなった。すなわち、Jen1-GFP の分子量が大きくなることが認められた (Figure 7A)。同様に *vrp1 Δ* 株における Jen1 Δ N-GFP および Jen1 Δ C-GFP の経時的な分子量変化をウェスタンブロット法によって解析したところ、Jen1 Δ N では効率が低いものの経時的な分子量の増加が認められた。それに対して、Jen1 Δ C では、分子量の増加は認められなかった (Figure 7A)。このバンドの移行は、グルコース刺激によって Jen1 がユビキチン修飾を受けたことで分子量が増加したものであると予想される。

そこで、免疫沈降法により Jen1 や Jen1 Δ N の分子量の増加がユビキチン修飾によるものであるか検証した。まず、*vrp1 Δ* 株で Jen1-GFP、Jen1 Δ N-GFP、Jen1 Δ C-GFP の発現を誘導した後、グルコースで 10 分間処理し菌体を回収した。回収した菌体から GFP 抗体と磁気ビーズによって、Jen1 を免疫沈降した。ウェスタンブロット法により免疫沈降物を解析した結果、野生型 Jen1 および Jen1 Δ N 発現株では、移動度が低い分子種のみが抗ユビキチン抗体で染色されていた。それに対して、Jen1 Δ C 発現株ではユビキチン陽性のバンドをほとんど検出することができなかった (Figure 7B)。すなわち、野生型 Jen1 と Jen1 Δ N のグルコース依存的な分子量の増加は、ユビキチン修飾によるものであることが明らかとなった。また、Jen1 Δ C ではグルコース刺激に応答したユビキチン化が抑制されていたことから、Jen1 のユビキチン化には C 末端領域が重要であることが明らかとなった。

多くの膜輸送体のユビキチン化はアダプタータンパク質を介した Rsp5 によって制御されている。それゆえ、Jen1 および N 末端領域欠損変異体で見られるグルコース依存的なユビキチン化は、アダプター依存的に行われているのか検証することとした。Jen1 の原形質膜上からの取り込みには、少なくとも Rod1、Bul1、Bul2 の 3 つの Rsp5 アダプタータンパク質の関与が示唆されている (葛西 2011、Figures 3)。しかし、Bul1、Bul2 のグルコース依存的な Jen1 分解における貢献は、主要なアダプタータンパク質として機能する Rod1 と比べて非常に小さい。そこで、まずは *ROD1* 遺伝子と *VRP1* 遺伝子を破壊した *rod1 Δ vrp1 Δ* 株に野生型の Jen1-GFP や Jen1 Δ N-GFP を発現させ、グルコース添加後のユビキチン修飾をウェスタンブロット法により解析した。その結果、*ROD1* 遺伝子が欠損した株では、野生型の Jen1 や Jen1 Δ N の分子量の増加が抑制されて

いた (Figure 7C)。すなわち、*vrp1Δ* 株でみられた野生型の Jen1 や Jen1ΔN のユビキチン化は主に Rod1 依存的に制御されていることが示唆された。

以上の結果より、Rod1 を介したグルコース依存的な Jen1 のユビキチン化には、Jen1 の N 末端領域および C 末端領域が重要であることが示唆された。特に、Jen1C 末端領域が欠損することで顕著にユビキチン修飾が阻害されることから、Rod1-Rsp5 複合体が Jen1 をユビキチン化するためには少なくとも C 末端領域が必要であることが明らかとなった。

3-2-2 Jen1 部分欠損変異体と Rod1 との相互作用解析

Jen1 の N 末端領域や C 末端領域が欠損することで、Jen1 の分解は抑制される。3-2-1 により、この分解抑制はそれぞれの領域が欠損することで Jen1 のユビキチン化が低下するため生じていることが明らかとされた。この Jen1 の N 末端領域や C 末端領域欠損変異体で見られるグルコース依存的なユビキチン化の抑制は、アダプタータンパク質との相互作用を失ったことにより起きたものであると予想した。そこで、主要なアダプター Rod1 と Jen1、およびその変異体との相互作用を解析することとした。

まず、Jen1 の分解に特に重要な C 末端領域と Rod1 間の直接的な相互作用を *in vitro* (GST-プルダウンアッセイ) で解析を試みた。しかし、大腸菌から精製した Jen1 C 末端領域と GST の融合タンパク質と、酵母の細胞抽出液中の Rod1 間での相互作用は認められなかった。そのため、Rod1 が Jen1 を認識するためには、Jen1 タンパク質中の一部部分だけでは不十分であること、または Jen1 の翻訳後修飾が必要である可能性が示唆された。そこで、*in vivo* での相互作用解析を行うこととした。本実験では、Jen1ΔN および Jen1ΔC は、Rod1 によって正常に認識されているかを二分子蛍光相補性試験 (Bimolecular fluorescent complementation assay; BiFC 法) により解析した。

BiFC 法は、蛍光タンパク質を N 末端断片および C 末端断片に分割したものを利用し、タンパク質間の相互作用を解析する手法である (Figure 8A)。分割された蛍光タンパク質の蛍光シグナルは、断片同士が接近し構造を相補し合うことで観察することができる。すなわち、タンパク質間の相互作用を解析したいタンパク質に、蛍光タンパク質の N 末端断片または C 末端断片をそれぞれ融合させることで、蛍光タンパク質の成熟の有無 (蛍光シグナルの有無) によりタンパク質間の相互作用の有無を解析することができる方法である。また、その蛍光シグナルの局在により細胞内での相互作用している場所も解析できる (Kerppola, 2008)。

本実験では、強化型黄色蛍光タンパク質 Venus を 2 分割したタンパク質 (Venus N 末端断片 (VN) および Venus C 末端断片 (VC)) を使用した。まず、これらの断片を Jen1 または Rod1 に融合させたプラスミド (pRS416-*JEN1*-VN, pRS415-*TDH3p*-*ROD1*-VC) を作製し、Jen1 と Rod1 が互いに相互作用しているのかを検証した。作製したプラスミドを用いて *jen1Δ rod1Δ* 株を形質転換させた。そして、この株を SLac-Ura/Lue 培地で培養することで Jen1 の発現を誘導し、グルコース添加後の Jen1 と Rod1 間の相互作用

を解析した。その結果、グルコース非存在下ではほとんど蛍光シグナルが検出されなかったが、グルコースが添加されると原形質膜上において蛍光シグナルが観察された。この結果より Jen1 と Rod1 はグルコース刺激に応答し、原形質膜上にて互いに相互作用していることが示された (Figure 8B)。次に、Jen1 の N 末端または C 末端領域を欠損させた変異体 Jen1 Δ N-VN または Jen1 Δ C-VN を発現させ、同様に Rod1-VC との相互作用解析を行った。その結果、N 末端領域欠損変異体ではグルコース添加後に膜上において蛍光シグナルが観察されるものの、そのシグナル強度は弱かった。また、C 末端領域欠損変異体ではグルコース添加後も蛍光シグナルはほとんど検出されなかった (Figure 8B)。この結果より、Rod1 が Jen1 を認識するためには、Jen1 の N および C 末端領域が必要な領域であることが示唆された。そして、Rod1 との相互作用には特に C 末端領域が重要であることが示唆された。また、両領域がそれぞれ欠損することにより起きる Jen1 の分解抑制は、Rod1 との相互作用が弱まり Rsp5 によるユビキチン化が抑制されたためであると考えられる。

3-2-3 Jen1 の C 末端領域部分欠損変異体を用いた Rod1 結合領域の探索

Jen1 の C 末端領域の欠損により、グルコース不活性化による Jen1 の分解が著しく抑制されることが明らかとなった。また、この分解抑制は Rod1 との相互作用が弱まったことが原因であると予想される。これまでの解析では、Jen1 の C 末端領域を大きく欠失させた変異体を使用して解析を行ってきた (Figure 3)。そこで、次は欠損させる領域を徐々に小さくした変異体 (Figure 9A)を用いることで、C 末端領域のどの部分が Rod1 に認識されるために重要であるのかを検証した。

C 末端領域の欠損は、Jen1(Δ C; Δ 574-616)に対して機械的に 10 アミノ酸残基ずつ欠損する領域を小さくした。すなわち、584-616 番目のアミノ酸残基を欠損した Jen1(Δ 584-616)、594-616 番目のアミノ酸残基を欠損した Jen1(Δ 594-616)および 604-616 番目のアミノ酸残基を欠損した Jen1(Δ 604-616)の GFP 融合タンパク質を *jen1 Δ* 株に発現させた。GFP 融合タンパク質発現株を SLac-Ura 培地で培養することにより各 Jen1 変異体の発現を誘導した後、グルコースを添加し Jen1 の膜からの取り込みと分解を経時的に観察した。蛍光顕微鏡を用いた Jen1 変異体の局在観察の結果、いずれの変異体でも Jen1 の原形質膜からの消失が著しく遅延していた (Figure 9B)。さらに、これらの変異体において、経時的なグルコース添加後の分解をウェスタンブロット法によって解析した。その結果、どの Jen1 変異体も野生型と比べて分解が抑制されていた (Figure 9C)。この結果は Jen1-GFP 変異体の局在観察と一致していた。以上の解析より、少なくとも Jen1 の 604-616 番目のアミノ酸残基領域は Rod1 に認識されるために必要であることが示唆された。

3-2-4 Jen1 部位特異的変異体を用いた Rod1 結合領域の探索

3-2-3 の解析により、604-616 番目のアミノ酸残基の中に Rod1 により認識されるために重要な領域が存在していると予測される。604-616 番目のアミノ酸残基の領域中には酸性アミノ酸に富んだ領域 (Glu⁶¹⁰-Glu-His-Ile-Glu; Figure 10A)が存在していた。これまでに、メチオニン高親和性輸送体 Mup1 やアルギニン輸送体 Can1 において、これらの N 末端領域中に存在する酸性アミノ酸残基がアダプターとの結合に必要であることが報告されている (Guiney *et al.*, 2016)。そこで、上述した酸性アミノ酸豊富な領域を中心に、Jen1-GFP の C 末端領域のアミノ酸残基をアラニンに置換した Jen1 変異体 (E610A,E611A 変異、H612A,I613A,E614A 変異、T615A,V616A 変異) の発現コンストラクトを作製し、Rod1 依存的な分解に与える影響を解析した。E610A,E611A 変異体および T615A,V616A 変異体の細胞内への取り込みや分解に遅延は認められなかった。それに対して、H612A,I613A,E614A 変異体 (以下 3A 変異体と呼ぶ) の分解は著しく遅延した (Figure 10B and C)。この結果より、Rod1 による Jen1 認識には、Jen1 の C 末端領域に存在する His⁶¹²、Ile⁶¹³、Glu⁶¹⁴ からなる 3 残基、もしくはそのいずれかが重要であると考えられた。一方で、Glu⁶¹⁰ と Glu⁶¹¹ からなる酸性アミノ酸残基は重要でないことが明らかとなった。

そこで、Jen1 の 612-614 番目のアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した Jen1-GFP 変異体 (H612A 変異、I613A 変異、E614A 変異) の解析を行った。その結果、E614A 変異体の分解が著しく遅延したのに対して、H612A 変異体や I613A 変異体は正常に分解された (Figure 11)。興味深いことに、His⁶¹² および Ile⁶¹³ を同時にアラニン置換した H612A,I613A 変異体のグルコースに応答した分解は E614A 変異体と同様に抑制された (Figure 11A)。これらの結果から、Jen1 のグルコース依存的な分解には、Jen1 の 614 番目のグルタミン酸残基だけでなく、612 番目のヒスチジンおよび 613 番目のイソロイシン残基も重要であることが明らかとなった。

3-2-5 Jen1 3A 変異体のグルコースに応答したユビキチン化

Jen1 の C 末端領域中の His⁶¹²-Ile-Glu 配列の変異は、グルコース刺激に応答した Jen1 の原形質膜上からの取り込みを顕著に抑制することから (Figure 10)、3A 変異体においてグルコース刺激に応答したユビキチン化が抑制されているのか検証した。3-2-1 に従い、エンドサイトーシス抑制株 *vrp1Δ* 株で Jen1(3A)-GFP を発現させ、ウェスタンブロット法によるグルコース添加後の Jen1-GFP の移動度の経時的な変化を調べた。その結果、Jen1(3A)-GFP 発現株では野生型で見られたユビキチン修飾による経時的な Jen1-GFP の分子量の増加が著しく抑制されていた (Figure 12A)。すなわち、Jen1 のユビキチン化には C 末端領域中の His⁶¹²-Ile-Glu 配列が重要であることが明らかとなった。

3-2-6 Jen1(3A)変異体と Rod1 との相互作用解析

3-2-5 の結果を受け、Rod1 と Jen1(3A)変異体との相互作用を BiFC 法により解析する

こととした。3-2-2と同様に、蛍光タンパク質 Venus の VN および VC 断片を Jen1(3A) または Rod1 に融合させたプラスミド (pRS416-*jen1*(3A)-VN, pRS415-*TDH3p-ROD1-VC*)を作製した。作製したプラスミドを *jen1Δ rod1Δ* 株に形質転換し、SLac-Ura/Lue 培地で培養することで Jen1 の発現を誘導した。グルコース添加後の Jen1 と Rod1 間の相互作用を解析した結果、野生型で見られた原形質膜上での蛍光シグナルは Jen1(3A)-VN 発現株ではほとんど検出されなかった (Figure 12B)。この結果より、Jen1 の His⁶¹²-Ile-Glu 配列は Rod1 が認識するために必要な領域であることが示された。

3-3 Jen1 および Jen1(3A)変異体の N 末端へのエピトープタグ融合体のグルコース依存的な分解

3-1 および 3-2 では、主に Jen1 の C 末端へ GFP を融合させたものを解析に用いている。タグと C 末端領域の人為的な相互作用が Jen1 の Rod1 を介した分解を誘発している可能性を否定するため、N 末端にエピトープタグを付加した Jen1 を用いて再現性が得られるか検証した。

まず、N 末端に GFP を付加した GFP-Jen1 および GFP-Jen1(3A)を *JEN1* プロモーター支配下で発現させ、グルコース添加後の局在変化を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、野生型 GFP-Jen1 はグルコース依存的に速やかに細胞内へ取り込まれることが明らかとなった。この細胞内への取り込みは、*ROD1* 遺伝子が欠損することで遅延した。また、Jen1 に 3A 変異を導入することで、グルコース依存的な細胞内への取り込みが抑制された (Figure 13A)。これらの結果から、Jen1 はタグの位置に関わらず Rod1 依存的、His⁶¹²-Ile-Glu 配列依存的にグルコース不活性化を受けることが示された。

次に、Jen1 の N 末端に 3xFLAG タグを融合させた 3FLAG-Jen1 および 3FLAG-Jen1(3A)を *JEN1* プロモーター支配下で発現させ、グルコース添加後の Jen1 の分解をウェスタンブロット法で解析した。その結果、*rod1Δ*株においてグルコース依存的な Jen1 の分解は大幅に抑制され、さらに 3A 変異を導入した 3FLAG-Jen1(3A)の分解も著しく抑制された (Figure 13B)。この結果は、蛍光顕微鏡を用いた GFP-Jen1 の局在観察や Jen1-GFP のウェスタンブロット解析で得られた結果と一致するものであった。

以上の結果より、Jen1 の C 末端へのエピトープタグ (GFP)の付加は Rod1 による認識には影響を及ぼさないことが示された。

以上より、Rod1 はグルコースシグナルに応答して Jen1 の C 末端領域を認識することで、Rsp5 による Jen1 のユビキチン化を仲介することが明らかとなった。また、Rod1 が Jen1 に結合するためには、His⁶¹²、Ile⁶¹³、Glu⁶¹⁴ アミノ酸残基が必要であり、これらをアラニン置換した 3A 変異の導入によって Rod1 との相互作用が失われユビキチン化が抑制されるため、グルコース依存的な分解が著しく遅延することが示された。

4 考察

環境の変化に応じた原形質膜の再構築は細胞の恒常性維持において重要な機構であり、細胞内では常に正と負の2つの制御の協調的な調節が行われている。正の制御は、必要なタンパク質の遺伝子発現の活性化による合成の促進、および原形質膜へのタンパク質輸送からなる。また、負の制御は不要なタンパク質の遺伝子発現の抑制、および膜上からのタンパク質の除去からなる。本研究では負の制御、すなわち環境の変化に応答した膜タンパク質の選択的な分解制御機構について解析を行った。出芽酵母はユビキチンリガーゼ Rsp5 依存的なユビキチン化により標的タンパク質の分解を誘導しているが、状況に応じて標的の選択的な分解を行うために、ユビキチン化を仲介するアダプタータンパク質の活性を制御していることが示唆されている。その一方で、輸送体のユビキチン化におけるアダプタータンパク質による輸送体の認識機構には不明な点が多い。本章では、グルコース依存的な Jen1 の分解において機能する Rsp5 アダプタータンパク質による Jen1 の認識領域、特に Jen1 分解における主要なアダプタータンパク質 Rod1 の Jen1 認識配列の解明を試みた。

その結果、グルコース誘導性の Jen1 の分解において主要なアダプタータンパク質として機能する Rod1 は、Jen1 の N 末端および C 末端領域を認識しており、特に C 末端領域に存在する His⁶¹²、Ile⁶¹³、Glu⁶¹⁴ のアミノ酸残基が重要であることが明らかになった。一方で、Jen1 の分解に関与している Rod1 以外のアダプタータンパク質の大部分は Jen1 の N 末端領域を認識していることが示唆された。それゆえ、実際に 3A 変異に加え Jen1 の N 末端領域を欠失させることで、グルコース存在下でも分解が著しく抑制され、膜上に局在し続ける Jen1 変異体(Jen1(Δ N, 3A))も得られた。

・アダプタータンパク質 Rod1 によるグルコース依存的な Jen1 認識領域の探索

これまでに、Mup1 や Can1 の分解において、Acidic patch と呼ばれる N 末端領域中の酸性アミノ酸がアダプタータンパク質 (Ldb19)との結合に重要であることが報告されている。また、Ldb19 中の特定のアルギニン酸へ変異を導入することでも、Mup1 の分解は遅延することから、Mup1 と Ldb19 の相互作用には、電気的な作用が必要であると予想されている (Guiney *et al.*, 2016)。本研究では、Jen1 の 614 番目のグルタミン酸をアラニン置換するだけで、Jen1 の分解が遅延することが観察された。一方で、興味深いことに、Rod1 との相互作用に重要な Jen1 C 末端領域中の3残基に隣接する酸性アミノ酸2残基 (610Glu および 611Glu) をアラニン置換した Jen1 変異体は正常に分解された (Figure 10)。このことから、Jen1 と Rod1 間の相互作用では、Mup1 や Can1 のようにアダプターから認識される領域とアダプターが電気的な作用によって相互作用する可能性は低いのではないかと考えられる。しかし、本実験の問題点として、Jen1 C 末端領域のアミノ酸残基をアラニン置換した変異体を解析に用いていることが挙げられる。例えば、Jen1(E614A)変異体では、グルタミン酸をアラニンに置換することでグルコース依存的な分解の遅延が認められたが (Figure 11)、グルタミン酸とアラニンで

はアミノ酸の性質、側鎖の大きさが大きく異なる。そのため、アミノ酸の荷電が本当に重要ではないのかを評価するためには、上述したグルタミン酸残基をグルタミンに置換することで、荷電を失くしつつも、より穏やかな変異を導入する必要がある。

また、本研究で明らかとされたこの 612 番目から 614 番目のアミノ酸残基は、塩基性のアミノ酸 His と分岐鎖アミノ酸 Ile、酸性アミノ酸 Glu から構成されており、その性質に共通性がなく、この配列が Rod1 による輸送体認識のコンセンサスな配列であるのかも不明である。そのため、Jen1 だけでなく Rod1 によって分解が制御されている他の膜タンパク質においても解析を進める必要がある。例えば、Jen1 と同様にグルコース依存的に分解される高親和性ヘキソース輸送体である Hxt6 も Rod1 が主要なアダプターとして機能している (Nikko and Pelham, 2009; Llopis-Torregrosa *et al.*, 2016)。実際に、グルコース依存的な Jen1 の 612 番目から 614 番目のアミノ酸残基 (HIE) と類似した配列が Hxt6 の配列中に存在するのか調べたところ、Hxt6 の N および C 末端領域中には認められなかった。その他に、グリセロール輸送体 Stt1 もグルコース依存的な分解において Rod1 がアダプターとして機能することが報告されているが (Alvaro *et al.*, 2014; Becuwe and Léon, 2014)、Stt1 も同様に HIE またはそれに類似した配列が認められなかった。そのため、Rod1 が認識する共通のモチーフやドメインが同定されるためには、各輸送体において Rod1 の認識に重要な配列を明らかにする必要がある。また、これら原形質膜タンパク質の分解において、Hxt6 はグルコースを輸送基質として取り込んでいる一方で、Jen1 や Stt1 の分解ではグルコースは分解シグナルとして機能する。この分解様式の違いとアダプターによる標的認識に関しては第 2 章で考察するが、分解様式の違いによって Rod1 による認識配列にも違いがあるのか非常に興味を持たれる。そのため、Jen1 以外で Rod1 が主要なアダプターとして機能する輸送体を用いて解析を進めることで、Rod1 の原形質膜タンパク質認識機構のさらなる解明が期待される。

ところで、Mup1 や Can1 分解において提唱された Acidic patch の重要性とは異なり、アミノ酸高親和性輸送体 Gap1 分解において、その C 末端領域に存在する α -ヘリックス上のグルタミン酸のリジンへの置換や連続するロイシン 2 残基のアラニンへの置換によって、それぞれの変異体のアンモニウム依存的な分解が抑制される報告がされている (Springael and André, 1998)。実際に Jen1 の C 末端領域の配列に対して Jpred 4.0 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) にて簡易的に 2 次構造を予測したところ、C 末端においても α -ヘリックス構造をとると予測される領域が存在し、その中に 612 番目から 614 番目のアミノ酸配列も含まれていた。ゆえに、Jen1 と Rod1 の相互作用には 2 次構造、もしくはさらに高次元である 3 次元的な構造が重要である可能性が考えられる。ただし、Jen1 C 末端の 2 次構造の存在はあくまで予測である。今後、結晶構造解析によって膜タンパク質である Jen1 や Rod1 の構造が解き明かされることで、Rod1 からの認識を構造上の観点から議論できるようになることが期待される。

・Rod1 を除く Rsp5 アダプタータンパク質による Jen1 認識領域の探索

当研究室の葛西による研究や本章の実験を通して、Jen1 のエンドサイトーシスにお

いて、Rod1 以外のアダプタータンパク質も Jen1 のユビキチン化に貢献していることが示唆された (葛西 2011; Figure 2)。そこで、*ROD1* 遺伝子破壊株 (*rod1Δjen1Δ*) をバックグラウンドに用いることで、グルコース依存的な Jen1 分解において Rod1 以外のアダプタータンパク質が Jen1 を認識する領域の探索を試みた。興味深いことに、N 末端が欠失した Jen1 変異体では、Jen1 の細胞内への取り込みや分解が著しく抑制された (Figure 6)。ゆえに、Rod1 以外の Jen1 を認識するアダプタータンパク質の大部分は Jen1 の N 末端領域を認識している可能性が示唆された。今後は、アダプタータンパク質群による Jen1 の認識機構の総合的な理解のために N 末端領域における Rod1 非依存的な Jen1 の分解に重要な部位の同定や、その領域と Rod1 以外のアダプタータンパク質との相互作用の解析を行うことが求められる。すでに、本章で Jen1 の分解において少なくとも Bul1/2 が関与していることを明らかにした。同時期にグルコース依存的な Jen1 分解には、Rod1 に加えて Bul1 が必要であり、Bul2 は関与しないことが報告されている (Hovsepian *et al.*, 2018)。そのため、まずは Bul1 による Jen1 の認識機構を解析することが望まれる。

また、乳酸を単一炭素源として培養し、Jen1-GFP の局在を蛍光顕微鏡で観察したとき、Jen1-GFP の原形質膜への局在とともに、液胞にもシグナルが認められた (Figure 2A)。このことは、Jen1 のエンドサイトーシスにはグルコース誘導性のモードのほか、構成的もしくは基質である乳酸依存的に起こるものがあることを意味している。近年の Talaia らの報告によると、乳酸培地中での培養により誘導されるエンドサイトーシスは、輸送活性を欠く Jen1 変異体において著しく抑制されることが報告されている (Talaia *et al.*, 2017)。すなわち、基質の取り込み依存的な分解が起きていると予想される。さらに、この基質依存的な分解は *BUL1/2* 二重遺伝子破壊株において著しく抑制されることが明らかとされた。本章の解析により、Jen1 の N 末端領域には、Rod1 や Bul1/2 をはじめとする複数のアダプタータンパク質が認識できる領域が存在することが示唆されている。それゆえ、N 末端領域が Jen1 の上述のようなグルコースシグナル以外で誘導される Jen1 のエンドサイトーシスに関与しているのかもしれない。今後、Jen1 の基質依存的なエンドサイトーシスを解析し、Jen1 の分解における二つのモードについて詳細な機構を明らかにすることで、アダプタータンパク質群による Jen1 の認識機構だけでなく、原形膜輸送体全般の認識機構の総合的な理解に繋がることが期待される。

・ Rsp5 アダプタータンパク質による Jen1 のユビキチン化

本章の解析により、グルコース依存的な Jen1 分解において、Rsp5 アダプタータンパク質による認識には Jen1 の N 末端および C 末端領域が重要であり、これらの領域が欠損すると、アダプターとの相互作用が失われることが明らかとなった。そのため、アダプターによる認識後、引き続き起こる Rsp5 によるユビキチン化も抑制されていた (Figures 7 and 8)。同様に、Rod1 との相互作用が低下した Jen1(3A)変異体においてもユビキチン化が抑制された (Figure 12)。Jen1 は 12 回膜貫通ドメインを持ち、その N 末端と C 末端領域の他に 6 番目と 7 番目の膜貫通ドメインの間に比較的大きな細胞質領

域（317-363 アミノ酸残基）の存在が推定されている。Peng ら（2003）による大規模なプロテーム解析により Jen1 の N 末端の 9 番目と、このループ領域中の 338 番目のリジン残基がユビキチン修飾を受けることが予測されている。Paiva らにより、338 番目のリジンをアルギニンに置換した Jen1(K338R)変異体のグルコース依存的な分解が遅延することが示されている (Peng *et al.*, 2003; Paiva *et al.*, 2009)。しかし、Jen1(K338R)変異体の分解は完全には阻害されず、またユビキチン化も起こっていることから、その他のユビキチン修飾部位の存在が示唆されている。Rod1 を介したグルコース依存的なユビキチン化部位を明らかにしたが、この点に関しては、第 2 章で述べる。

また、上述のプロテオーム解析は本実験のように、炭素源を変化させることによる厳密な Jen1 の発現や分解の制御を行っていない。そのため、推定されたリジン残基がアダプター-Rsp5 複合体特異的に修飾されるものであるのか不明である。現に、Paiva らの結果では、9 番目のリジンをアルギニンに置換した変異体では、グルコース依存的な分解に遅延が認められなかった。そのため、Jen1 のグルコース依存的なユビキチン修飾部位を明らかにするためには、非発酵性炭素源下で Jen1 を発現後、グルコース依存的な分解を誘導した条件下で質量分析が行われることが望まれる。また、野生株だけでなく、*ROD1* 遺伝子破壊株や *BUL1/2* 二重遺伝子破壊株においても、同様な解析が行われることでアダプターを介したユビキチン修飾部位が明らかにされることが期待される。

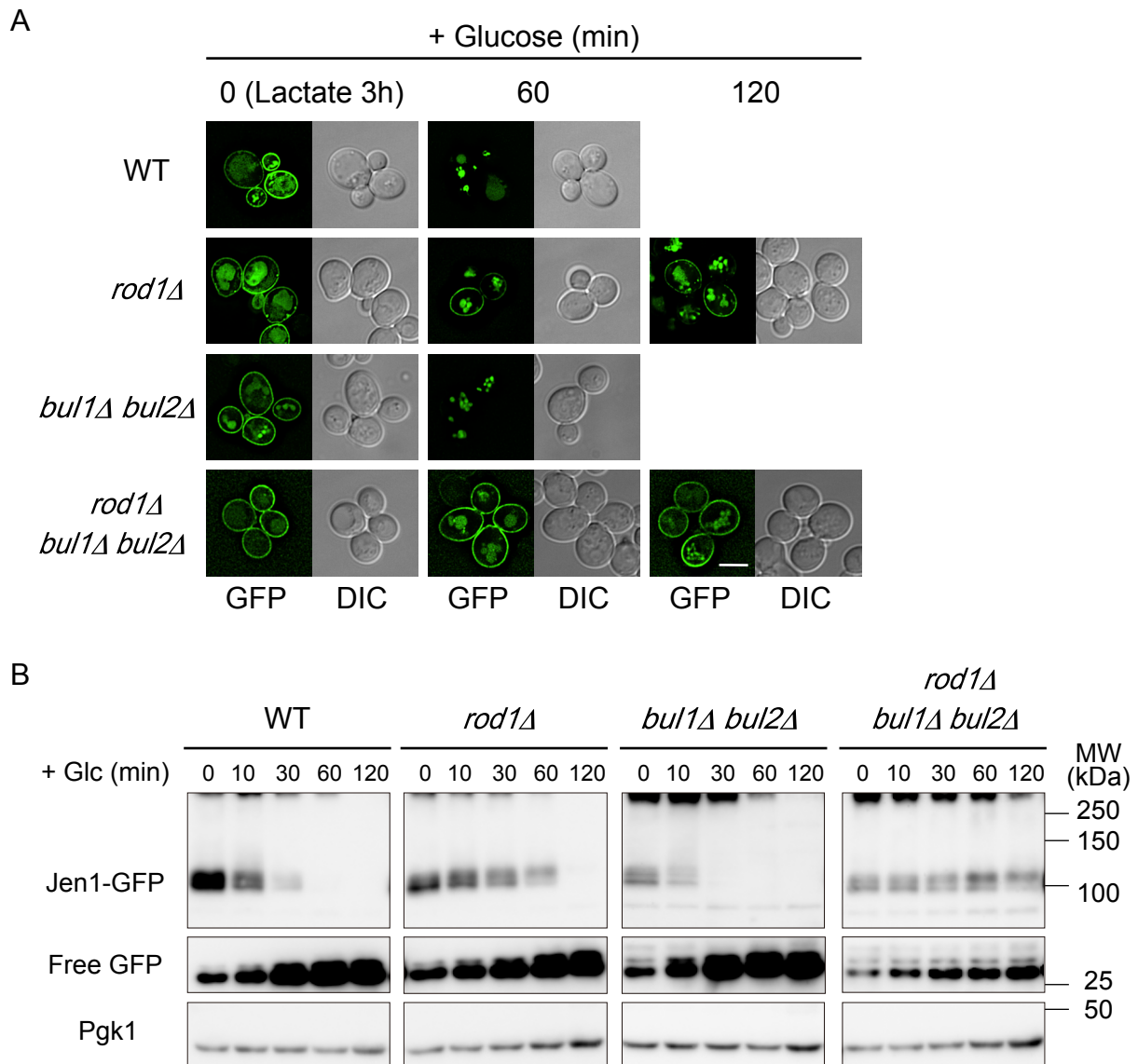


FIGURE 2. Adaptor proteins Bul1 and Bul2 play a minor role in internalization of Jen1 from the plasma membrane. *A*, The *jen1Δ* (WT), *rod1Δjen1Δ* (*rod1Δ*), *bul1Δbul2Δjen1Δ* (*bul1Δbul2Δ*), or *rod1Δbul1Δbul2Δjen1Δ* (*rod1Δbul1Δbul2Δ*) cells expressing Jen1-GFP were grown in HC(Lac) medium for 3 h to induce expression of Jen1-GFP and its derivatives. Glucose (a final concentration of 2%) was then added to the culture to terminate their expression and induce their endocytosis. The images were taken at 0, 60, and 120 min after glucose addition. The scale bar indicates 5 μ m. *B*, WT, *rod1Δ*, *bul1Δbul2Δ*, or *rod1Δbul1Δbul2Δ* cells expressing Jen1-GFP were grown as described in *A*. Equal volumes of the culture were harvested at the indicated times and total protein lysates were immunoblotted with anti-GFP and anti-Pgk1 antibodies. Pgk1 was detected on the same blots as the loading control.

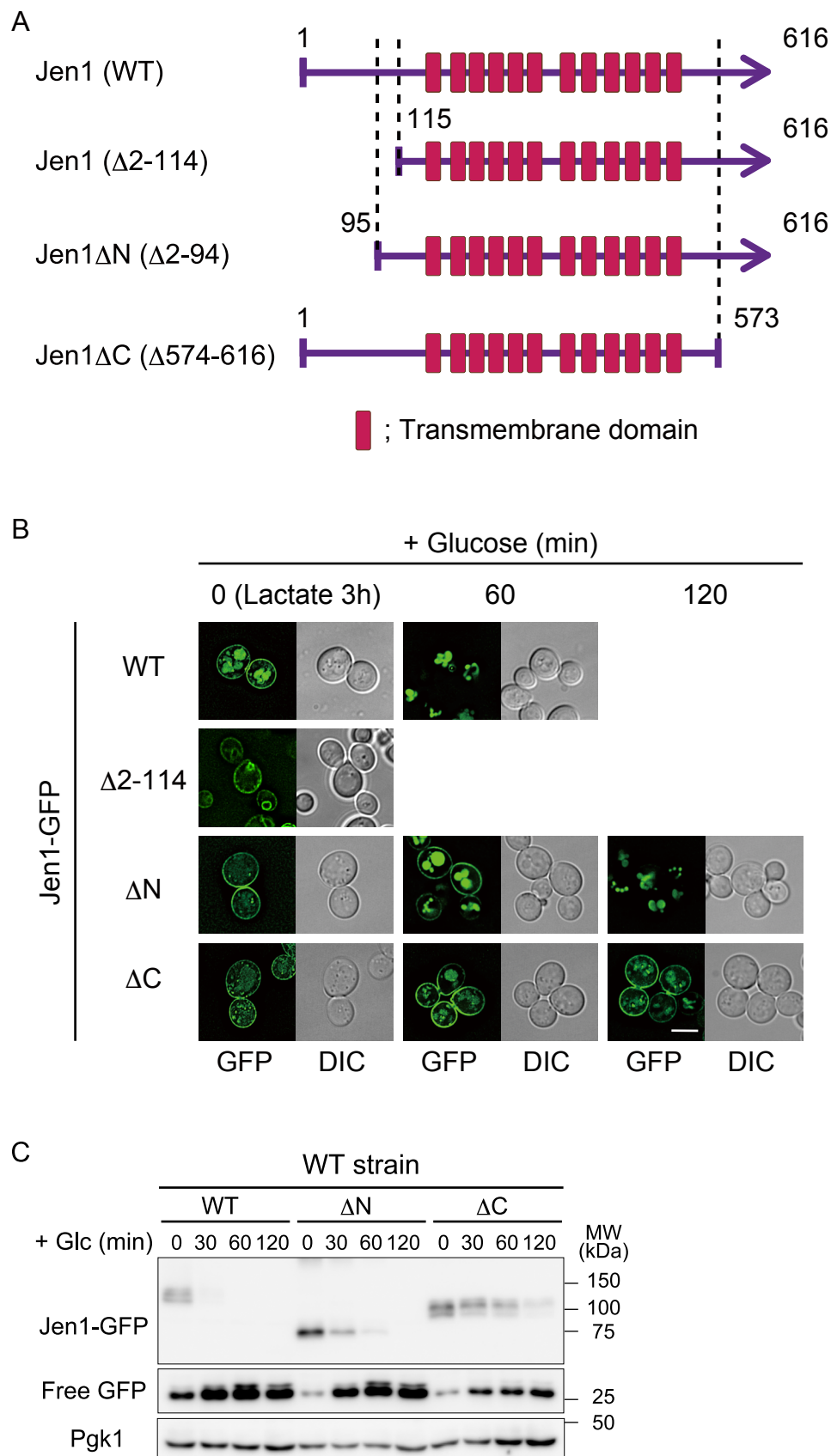
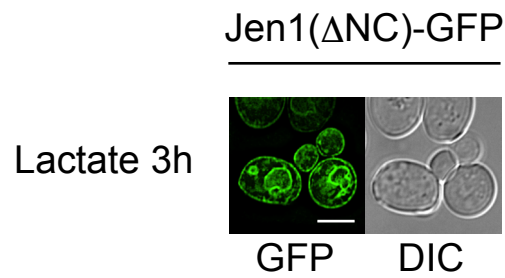


FIGURE 3. Degradation of GFP-tagged Jen1 mutants deleted for its N-terminal or C-terminal domain. *A*, Schematic model of Jen1 deletion mutants lacking the N-terminal or C-terminal cytoplasmic region. Purple lines show polypeptides of Jen1 deletion mutants. Boxes indicate predicted membrane-spanning α -helices (transmembrane domain). *B*, Fluorescence distribution of GFP-tagged Jen1 or its deletion mutants was analyzed in *jen1* Δ cells. Cells harboring pJen1-GFP (pSF3), pJen1($\Delta 2-114$)-GFP (pDS1), pJen1 Δ N-GFP (pSF5), or pJen1 Δ C-GFP (pDS2) were subjected to fluorescence microscopic analysis as described in Fig. 2*A*. The scale bar indicates 5 μ m. *C*, The *jen1* Δ cells expressing GFP-tagged Jen1 or its deletion mutants, excluded Jen1($\Delta 2-114$), were subjected to immunoblot analysis as described in Fig. 2*B*.

A



B

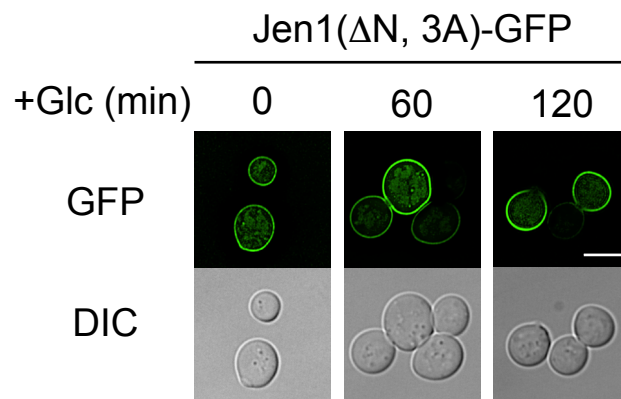


FIGURE 4. Jen1 mutated in both N-terminal and C-terminal cytoplasmic regions is highly resistant to glucose-induced endocytosis. A, The *jen1* Δ cells harboring pSF16 were grown in HC medium to an early log phase, and then transferred to HC(Lac) medium to induce expression of Jen1(Δ NC)-GFP (pSF16). After 3 h incubation, fluorescence and DIC images were taken. The scale bar indicates 5 μ m. B, The *jen1* Δ cells expressing Jen1(Δ N, 3A)-GFP (pSF18) was subjected to fluorescence microscopic analysis as described in Fig. 2B. The scale bar indicates 5 μ m.

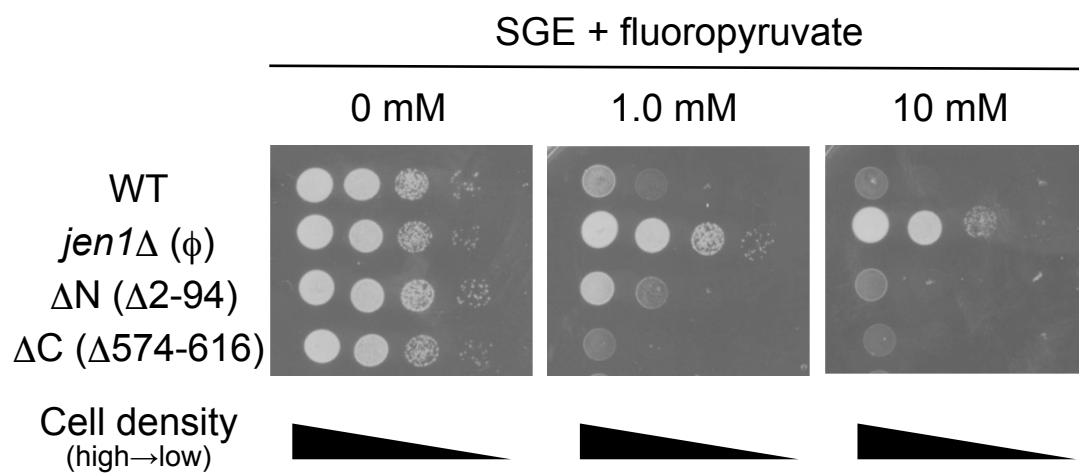


FIGURE 5. Sensitivity of Jen1 mutant strains to fluoropyruvate. The *jen1*Δ cells harboring pRS316(Φ), pJen1–GFP (pSF3), pJen1ΔN–GFP (pSF5), or pJen1ΔC–GFP (pDS2) were grown in HC(EG) medium to an early log phase, and spotted on HC(EG) plates containing 0, 1.0, and 10 mM fluoropyruvate.

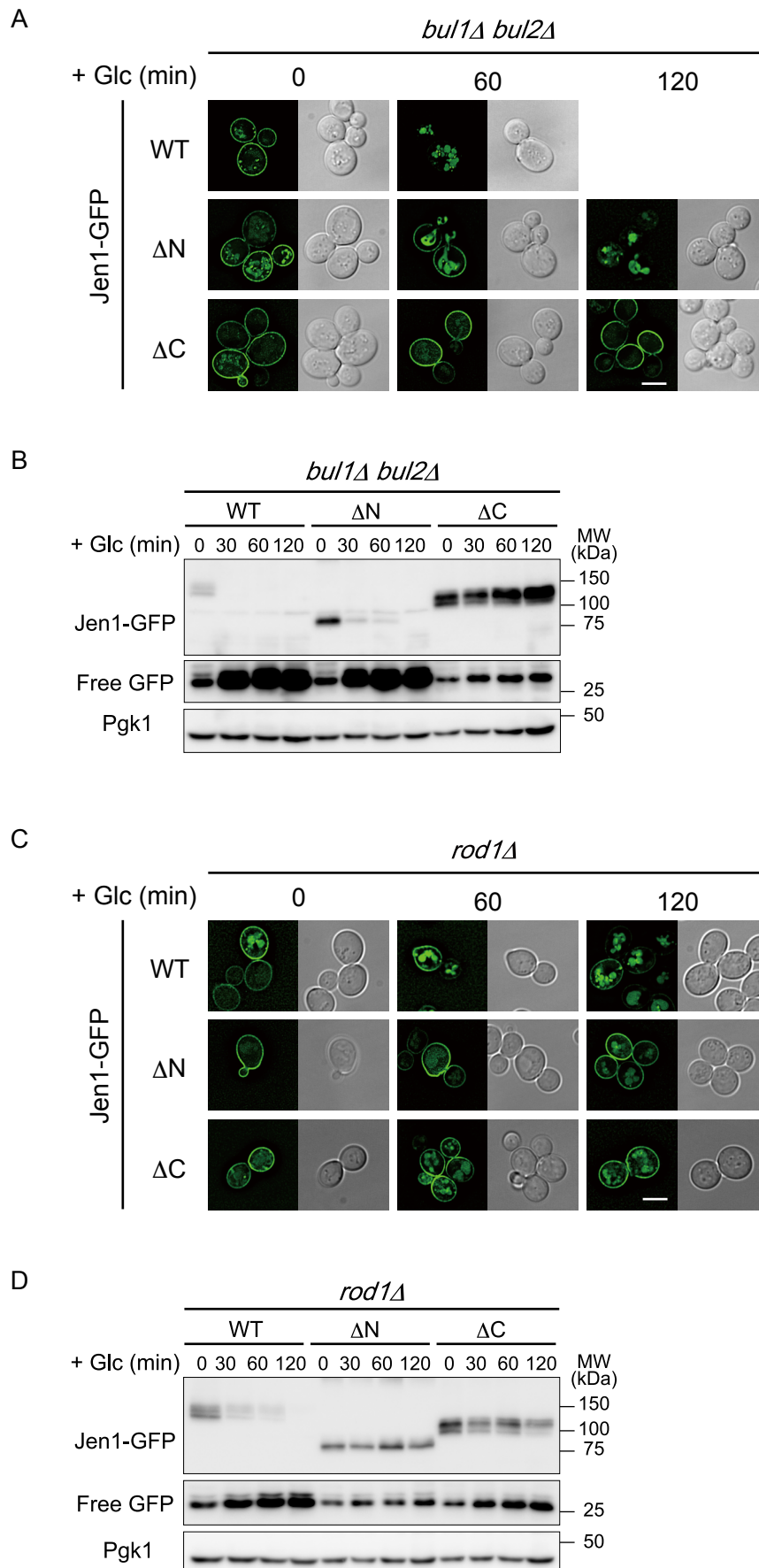
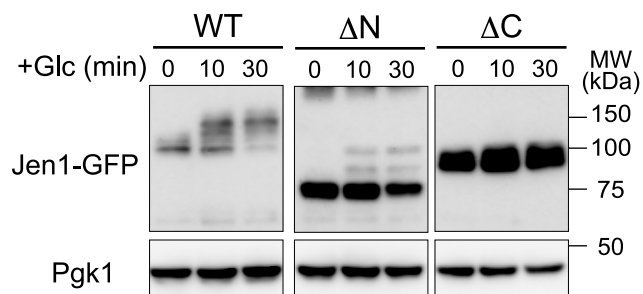
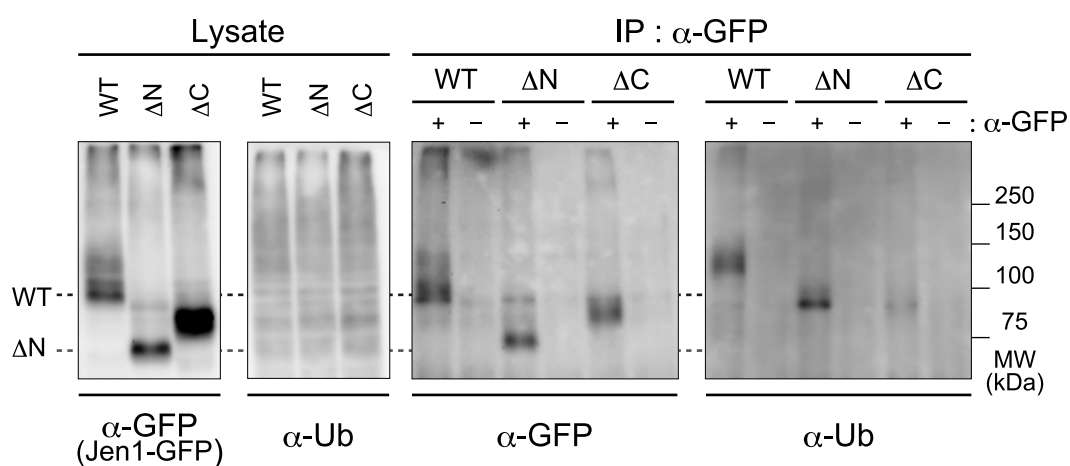


FIGURE 6. The cytoplasmic region of Jen1 is necessary for Rod1-dependent internalization of Jen1. *A* and *C*, Fluorescence distribution of GFP-tagged Jen1 or its deletion mutants was analyzed in the *bul1Δ bul2Δjen1Δ* (*A*) or *rod1Δjen1Δ* (*C*) cells. Cells harboring pJen1-GFP, pJen1ΔN-GFP, or pJen1ΔC-GFP were subjected to fluorescence microscopic analysis as described in Fig. 2*A*. The scale bar indicates 5 μm. *B* and *D*, Glucose-induced degradation of Jen1-GFP, Jen1ΔN-GFP, and Jen1ΔC-GFP expressed in *bul1Δ bul2Δjen1Δ* (*B*) and *rod1Δjen1Δ* (*D*) cells was analyzed by immunoblot analysis as described Fig. 2*B*.

A



B



C

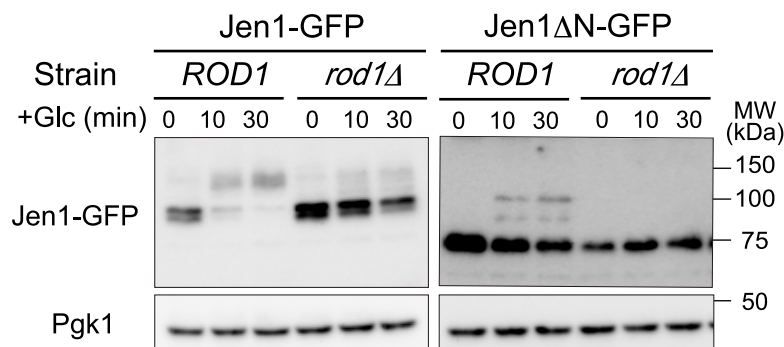
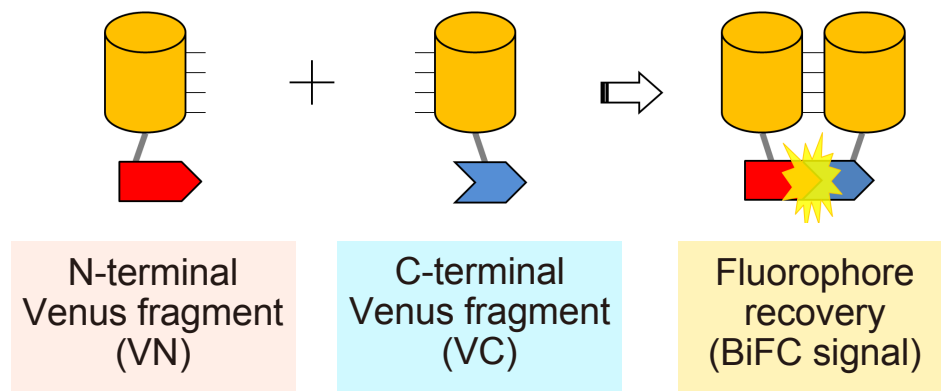


FIGURE 7. The cytoplasmic region of Jen1 is required for glucose-induced ubiquitination of Jen1. *A*, The *vrp1Δ* cells expressing GFP-tagged Jen1 or its derivatives (ΔN and ΔC) were grown and analyzed as described in Fig. 2B. *B*, The *vrp1Δ* cells expressing GFP-tagged Jen1 or its derivatives (ΔN and ΔC) were grown in HC(Lac) medium for 3 h, followed by treatment with glucose for 10 min. Total protein extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-GFP antibody, followed by immunoblot analysis with anti-GFP and anti-ubiquitin antibodies. *C*, The *vrp1Δ* (*ROD1*) or *vrp1Δ rod1Δ* (*rod1Δ*) cells expressing GFP-tagged Jen1 or Jen1ΔN were grown and analyzed as described in *A*.

A

Bimolecular fluorescent complementation (BiFC) assay

(Haider *et al.*, PLoS one 2011(modified))

B

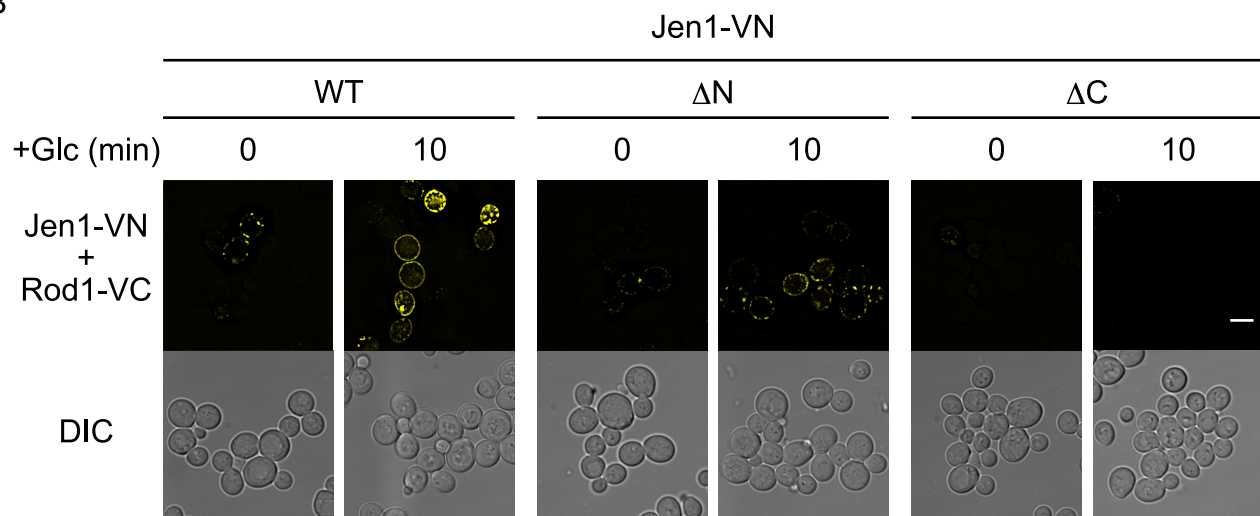


FIGURE 8. Interaction between Rod1 and Jen1 mutants lacking N-terminal or C-terminal region. *A*, The principle of BiFC assay. *B*, The *rod1Δjen1Δ* cells harboring the plasmid encoding Rod1-VC (pSF48) and the plasmid encoding either wild-type Jen1-VN (pSF26), Jen1 ΔN -VN (pSF27), or Jen1 ΔC -VN (pSF28) were grown in HC medium to an early log phase and then transferred to HC(Lac) medium to induce Jen1 expression. After 3 h incubation, glucose was added to the culture at a final concentration of 2% and cells were incubated for 10 min. Fluorescence from structurally complemented Venus was observed by fluorescence microscopy (BiFC assay). Differential interference contrast (DIC) images were also taken. The scale bar indicates 5 μ m.

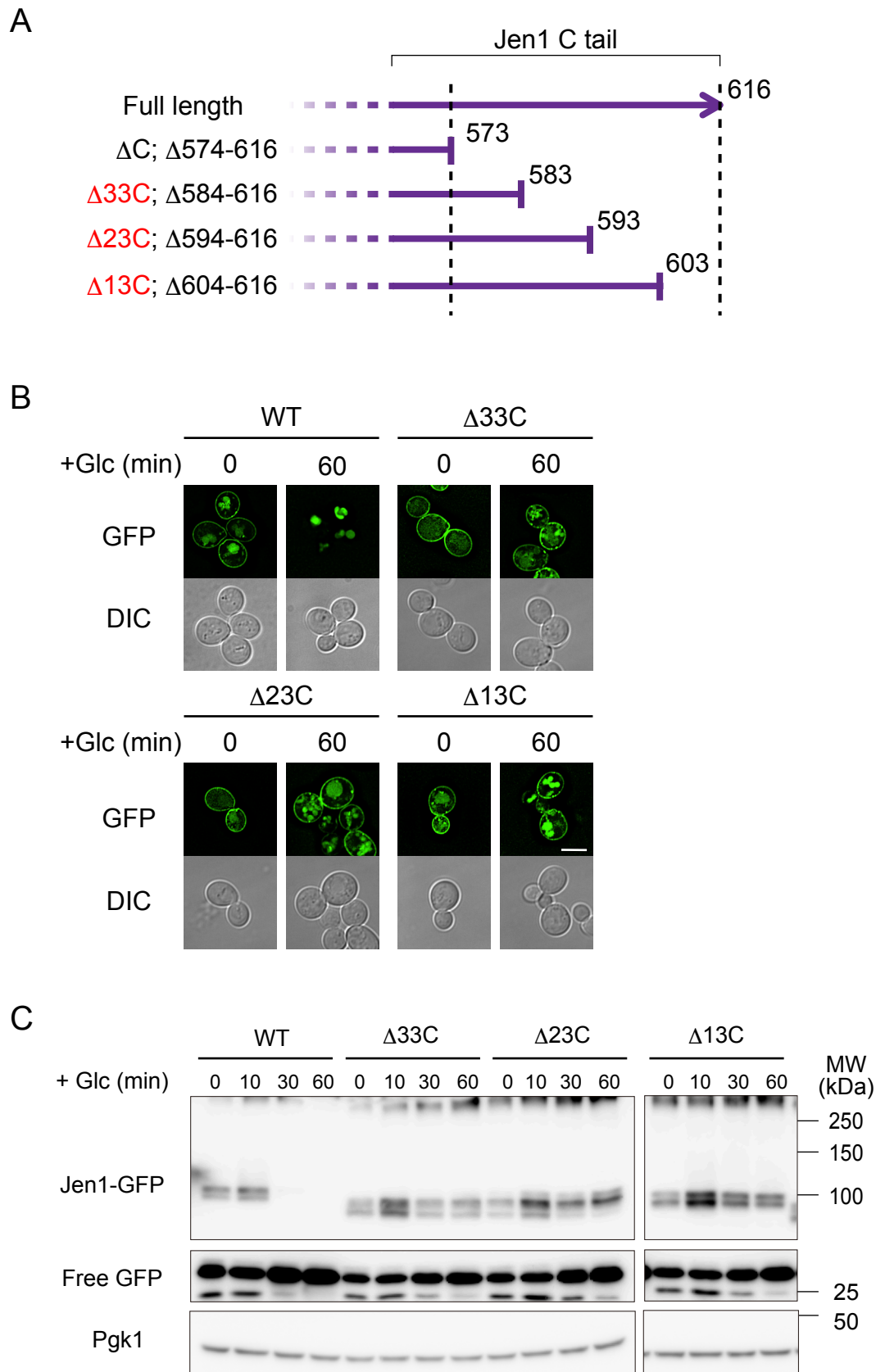


FIGURE 9. Systematic deletions of Jen1 revealed importance of the C-terminal 13 amino acids for its glucose-induced endocytosis. *A*, Schematic depiction of a series of Jen1 deletion mutants. Purple lines show polypeptides of Jen1 deletion mutants. *B* and *C*, The *jen1* Δ cells expressing Jen1-GFP or its derivatives, Jen1 Δ 33C-GFP (pSF8), Jen1 Δ 23C-GFP (pSF10), and Jen1 Δ 13C-GFP (pSF12), were subjected to fluorescence microscopic analysis (*B*) and immunoblot analysis (*C*) as described in Fig. 2. The scale bar indicates 5 μ m.

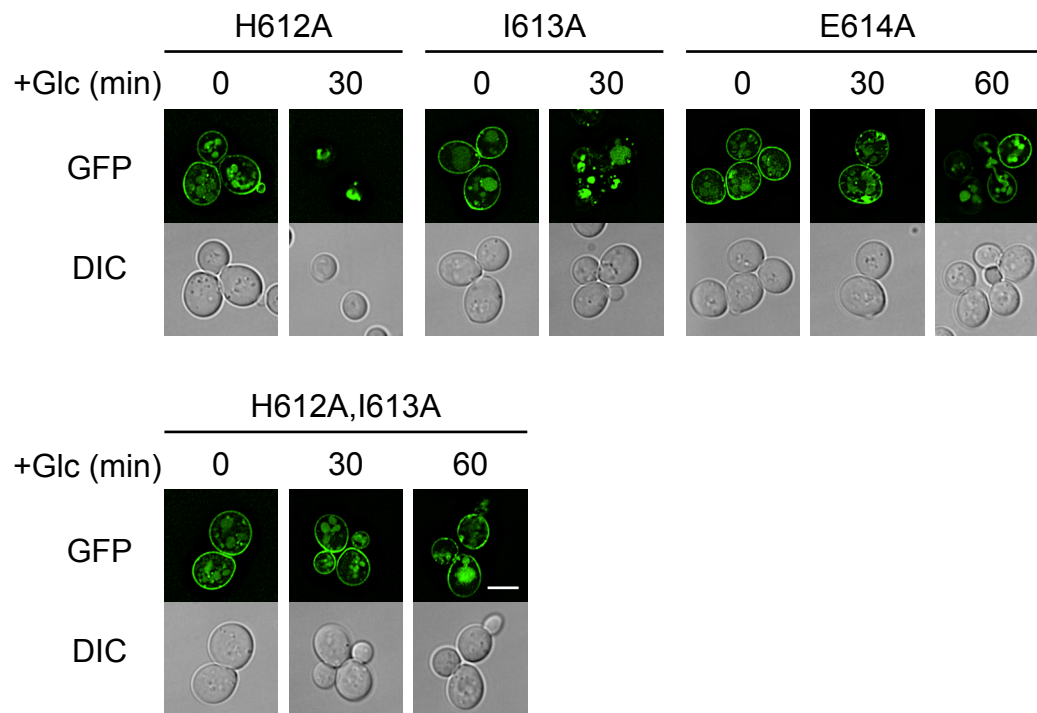


FIGURE 11. **Mutation analysis in His⁶¹²–Ile–Glu sequence of Jen1.** The *jen1*Δ cells expressing Jen1(H612A)–GFP (pSF40), Jen1(I613A)–GFP (pSF41), Jen1(E614A)–GFP (pSF42), or Jen1(H612A,I613A)–GFP (pSF38) were subjected to fluorescence microscopic analysis as described in Fig. 2A. The scale bar indicates 5 μm.

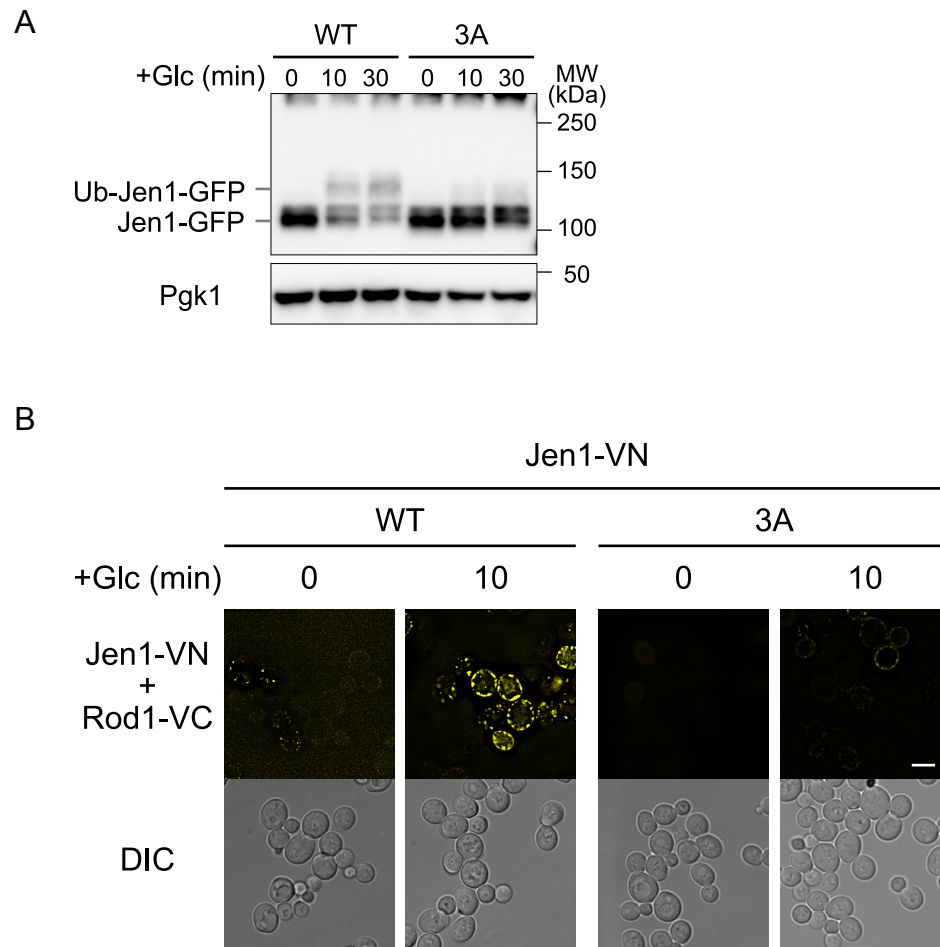


FIGURE 12. Alanine replacement mutation in His⁶¹², Ile⁶¹³, and Glu⁶¹⁴ of Jen1 resulted in loss of interaction with Rod1. *A*, Protein extracts from the *vrp1Δ* cells expressing wild-type Jen1–GFP or Jen1(3A)–GFP were analyzed by immunoblot analysis as described in Fig. 2*B*. *B*, The *rod1Δjen1Δ* cells harboring the plasmid encoding Rod1–VC (pSF48) and the plasmid encoding either wild-type Jen1–VN or Jen1(3A)–VN (pSF49) were subjected to BiFC analysis as shown in Fig. 8.

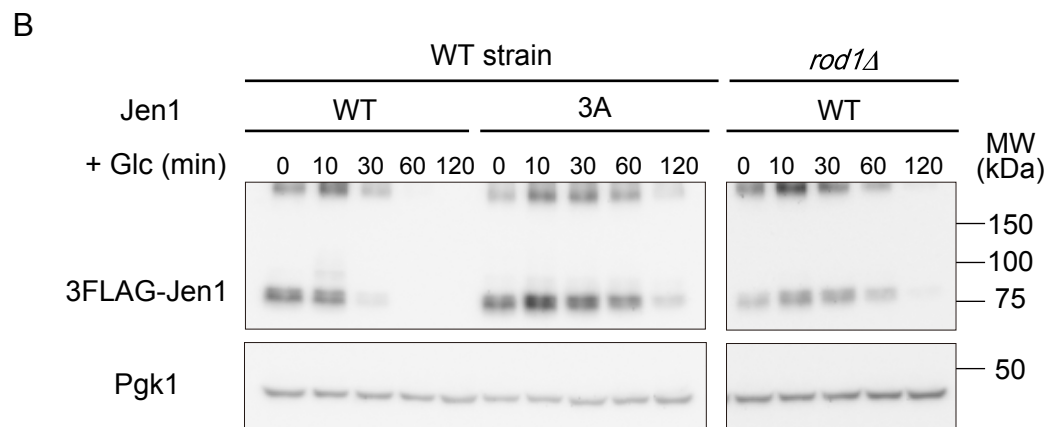
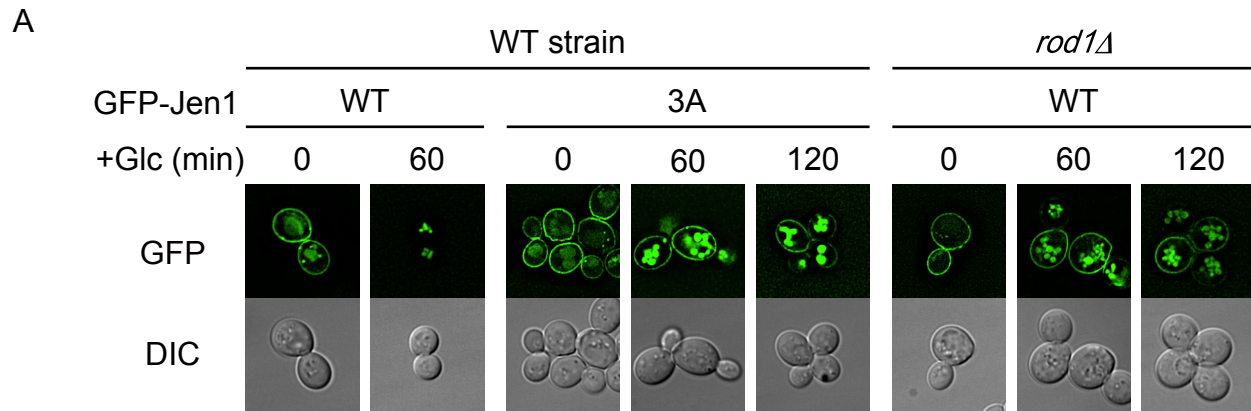


FIGURE 13. Glucose-induced degradation of N-terminally tagged Jen1. *A*, The *jen1Δ* (WT) or *jen1Δ rod1Δ* (*rod1Δ*) cells expressing GFP-Jen1 (pSF57) or GFP-Jen1(3A) (pSF58) under the control of the *JEN1* promoter were subjected to fluorescence microscopic analysis as described in Fig. 2*A*. *B*, The *jen1Δ* (WT) or *jen1Δ rod1Δ* (*rod1Δ*) cells expressing 3FLAG-Jen1 (pYT1) or 3FLAG-Jen1(3A) (pSF59) under the control of the *JEN1* promoter were grown as described in Fig. 2*B*. Degradation of 3FLAG-fused proteins was monitored by immunoblot analysis using an anti-DYKDDDDK antibody.

第二章

Jen1 の C 末端領域は Rod1 を介したグルコース依存的な分解において分解調節領域 (degron) として機能する

1. 緒言

多くの栄養源輸送体は、過剰な基質の存在によりエンドサイトーシス依存的に不活性化され、細胞内への過剰な基質の取り込みが制限される。近年の報告により、アミノ酸輸送体の基質濃度依存的な分解には、基質の輸送に伴う構造変化の必要性が提唱されている。基質濃度依存的なウラシル輸送体 Fur4 およびメチオニン輸送体 Mup1 の分解に関する報告により、外界環境中の基質が欠乏している状況 (基質非結合状態、Ground state) では、アダプターの結合に必要な領域である輸送体のコアドメイン中の細胞質ループの一部と細胞質中に局在する N 末端領域が会合することで分解を回避していることが示唆されている (Keener and Babst, 2013; Guiney *et al.*, 2016)。すなわち、基質非存在下では N 末端領域中に存在するアダプター-Rsp5 複合体の結合領域はマスクされるため、アダプタータンパク質からの認識を回避していると考えられている。一方で、基質との結合によって、輸送体の立体構造が変化し (active state)、それによって、アダプターによる認識領域がコアドメインから露出し、アダプターに認識される。さらに、細胞質中に暴露された N 末端領域のアダプター結合部位の近傍に局在するリジン残基がユビキチン修飾を受けることで、輸送体の分解が誘導されると予想されている。そのため、いくつかの輸送体 (Fur4 や Mup1、高親和性アミノ酸輸送体 Gap1、アルギニン輸送体 Can1) において、これらの輸送活性が欠損した変異体では基質濃度依存的な分解が抑制されることが報告されている (Keener and Babst, 2013; Ghaddar *et al.*, 2014; Guiney *et al.*, 2016)。また、メチオニン濃度依存的な Mup1 の分解において、アダプタータンパク質として機能する Ldb19 による認識には、Mup1 の N 末端領域の acidic patch と呼ばれる酸性アミノ酸豊富な領域だけでなくコアドメイン中の細胞質ループの一部も必要であることが示されている (Guiney *et al.*, 2016)。興味深いことに、構造解析をベースとして、哺乳動物細胞の β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) と β -アレスチンや、光受容体ロドプシンと視覚アレスチン (visual arrestin) 間の相互作用が解析された結果、アレスチンタンパク質はリン酸化されて細胞質中に暴露された C 末端領域のみならず、コア領域の一部 (Transmembrane bundle) と相互作用していることが明らかとされている (Shukla *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2016)。ゆえに、アレスチンの原形質膜タンパク質認識には、共通した機構が存在する可能性が示唆される。

一方で、いくつかの輸送体は輸送基質非依存的な不活性化制御を受ける。例えば、Gap1 は、基質濃度依存的な分解制御だけでなく、基質非依存的な分解制御も受けている。Gap1 の分解において、主要なアダプタータンパク質として機能する Bul1、Bul2 は、細胞内のアミノ酸濃度依存的な TOR (target of rapamycin) 複合体 1 (TORC1) キナーゼシグナル伝達経路によって制御されている。すなわち、低窒素源環境下では TORC1

キナーゼは不活性化状態となり、Npr1 キナーゼ依存的に Bul アダプターはリン酸化され不活性化状態となる。その一方で、Gap1 を介したアミノ酸の取り込みや富アンモニウム条件等、細胞内へ窒素源が十分量供給される環境下では、活性化状態の TORC1 キナーゼ依存的に Npr1 キナーゼが不活性化されるとともに、Bul アダプターのリン酸化が抑制され活性化状態となり、Gap1 の分解が誘導される (Merhi and André, 2012)。さらに、近年の研究において、基質の輸送活性を失った Gap1 変異体において、その他の輸送体を介したアミノ酸やアンモニウムの取り込みによって細胞内アミノ酸濃度が上昇すると、TORC1 キナーゼシグナル伝達経路が活性化され、Bul1/Bul2 依存的に分解されることが報告されている (Ghaddar *et al.*, 2014)。すなわち、基質の取り込みに依存した構造変化を伴わない、基質非依存的な分解制御を受けているのである。また、本研究でモデルとして使用した Jen1 もその一つであり、輸送基質ではないグルコースによって分解が誘導されており、その遺伝子発現はグルコースをはじめとした発酵性炭素源によって制御されている (Andrade and Casal, 2001; Lodi *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2002; Chambers *et al.*, 2004)。さらに、Jen1 の迅速な分解に必要なアダプタータンパク質 Rod1 の活性は Snf1-グルコースシグナル伝達経路 (Snf1 キナーゼによるリン酸化およびホスファターゼ (Glc7-Reg1)による脱リン酸化) によって制御されている (Becuwe *et al.*, 2012; Alvaro *et al.*, 2016)。輸送基質濃度依存的なエンドサイトーシスおよびシグナル伝達依存的なエンドサイトーシスの両方がアレスチン様アダプタータンパク質を利用するが、アダプターによる標的の認識機序の一般性、特異性の詳細は不明である。本章では、グルコースシグナル依存的に Rod1 により認識される Jen1 の認識機序を明らかにすることで、両者の違いを理解することを目的とした。

2. 実験材料および方法

下記以外は第一章の方法に従った。

2-1 使用菌株

本研究では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 を親株として用いた。また、単独遺伝子破壊株は Yeast MAT α collection (Open Biosystems)から得た。使用菌株は Table 6 に示した。

2-2 使用試薬

特に表記のない限り、和光純薬(株)の特級試薬を適宜オートクレーブ処理もしくはフィルター (Millipore, Millex® Syringe-driven Filter Unit)滅菌処理して用いた。各種制限酵素、修飾酵素はタカラバイオ、ロシュ・ダイアグノティクス、ニッポンジーン、ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパンのものを適宜使い、添付のプロトコルに従って反応させた。本研究で使用したオリゴヌクレオチド (Table 7)はユーロフィンジェノミクスでカスタム合成された。また、使用したオリゴヌクレオチドプライマーおよびプラスミドは Table 7 と Table 8 にそれぞれまとめた。

2-3 培地

第一章で用いた培地以外に使用した培地を下記に記載する。

- (1) SLac-Ura/Met 培地; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, amino acids (0.002% Arg, 0.010% Asp, 0.010% Glu, 0.008% Ile, 0.012% Lys, 0.005% Phe, 0.040% Ser, 0.020% Thr, 0.006% Tyr, 0.015% Val, 0.002% Leu, 0.002% Trp, 0.002% His), 0.5% DL-lactate, , 0.002% Ade, 2% raffinose
- (2) SRaff 培地; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, amino acids (0.002% Arg, 0.010% Asp, 0.010% Glu, 0.008% Ile, 0.012% Lys, 0.002% Met, 0.005% Phe, 0.040% Ser, 0.020% Thr, 0.006% Tyr, 0.015% Val, 0.002% Leu, 0.002% Trp, 0.002% His), 0.002% Ura, 0.002% Ade, 2% raffinose
- (3) SRaff-Met 培地; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, amino acids (0.002% Arg, 0.010% Asp, 0.010% Glu, 0.008% Ile, 0.012% Lys, 0.005% Phe, 0.040% Ser, 0.020% Thr, 0.006% Tyr, 0.015% Val, 0.002% Leu, 0.002% Trp, 0.002% His), 0.002% Ura, 0.002% Ade, 2% raffinose

(4) SRaff-Ura/Met 培地; 0.17% *FORMEDIUM*TM yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, amino acids (0.002% Arg, 0.010% Asp, 0.010% Glu, 0.008% Ile, 0.012% Lys, 0.005% Phe, 0.040% Ser, 0.020% Thr, 0.006% Tyr, 0.015% Val, 0.002% Leu, 0.002% Trp, 0.002% His), 0.002% Ade, 2% raffinose

2-4 プラスミド DNA の作製

本章で使用したプラスミドは第一章 2-8 に従い作製した。すなわち、プラスミドベクターへの DNA のクローニングには、ライゲーション反応または GRC 法 (Oldenburg *et al.*, 1997)を用いた。また、Jen1 や Mup1-Jen1C の部位特異的変異体を発現するプラスミド DNA は特に表記がない限り、第一章の 2-8-2 に従い GRC 法によって作製しており、DNA のクローニングに用いた鋳型 DNA やオリゴヌクレオチドプライマー、およびベクターの組み合わせは Table 9 に記載した。

2-5 Jen1 の発現誘導

特に表記のない限り、第一章 2-11 に従って発現誘導を行った。一方で、SRaff や SGE 培地を用いた、Jen1 の発現誘導は下記の通り行った。

菌株を SC 選択培地に植菌し、30°C で一晩培養した。翌日、一晩培養液を $OD_{600} = 0.25$ /mL となるように、同じ培地で希釈した。30°C で 4 時間培養した後、菌体を滅菌水にて一度洗浄し、 $OD_{600} = 1.0$ /mL となるように SRaff または SGE 選択培地に懸濁した。再び 30°C で 4 時間培養し、Jen1 の発現を誘導した。その後、蛍光顕微鏡による局在観察、全細胞タンパク質の抽出に用いた。

SC および SLac、SRaff、SGE 培地は行う実験によって培養スケールを変更した。また、酵母株が保持するプラスミドの選択マーカーに応じて適宜栄養源を抜いたものを使用した。

2-6 Mup1 および Mup1-Jen1C-GFP の発現誘導

2-6-1 Mup1 の内在性プロモーターによる Mup1-GFP および Mup1-Jen1C-GFP の発現誘導

菌株を SC 培地に植菌し、30°C で一晩培養した。翌日、一晩培養液を $OD_{600} = 0.25$ /mL となるように、同じ培地で希釈した。30°C で 4 時間培養した後、菌体を滅菌水にて一度洗浄し、 $OD_{600} = 1.0$ /mL となるように SRaff-Met 選択培地に懸濁した。再び 30°C で 3 時間培養し、Mup1 の発現を誘導した。その後、蛍光顕微鏡による局在観察や全細胞タンパク質の抽出に用いた。

SC および SRaff-Met 培地は実験によって培養スケールを変更した。また、菌体が保持するプラスミドの選択マーカーに応じて適宜栄養源を抜いたものを使用した。

2-6-2 Jen1 プロモーターによる Mup1-GFP および Mup1-Jen1C-GFP の発現誘導

菌株を SC 選択培地に植菌し、30°C で一晚培養した。翌日、一晚培養液を $OD_{600} = 0.25$ /mL となるように、同じ培地で希釈した。30°C で 4 時間培養した後、菌体を滅菌水にて一度洗浄し、 $OD_{600} = 1.0$ /mL となるように SLac-Met 選択培地に懸濁した。再び 30°C で 3 時間培養し、Jen1 の発現を誘導した。その後、蛍光顕微鏡による局在観察、全細胞タンパク質の抽出に用いた。

SC および SLac-Met 培地は行う実験によって培養スケールを変更した。また、酵母株が保持するプラスミドの選択マーカーに応じて適宜栄養源を抜いたものを使用した。

2-7 蛍光顕微鏡による GFP 融合タンパク質の局在観察

2-7-1 蛍光顕微鏡による Jen1-GFP の局在観察

特に表記のない限り、第一章 2-12 に従って局在観察を実施した。一方で、SRaff や SGE 培地を用いた、Jen1 の局在観察は本章の 2-5 に従い、SRaff または SGE 培地を SLac 培地の代わりに用いて誘導した。

Jen1-GFP の局在解析はデジタルカメラ ORCA-Flash2.8 (浜松ホトニクス) および解析ソフトウェア MetaMorph (Molecular Devices) を搭載した蛍光顕微鏡 IX71 (OLYMPUS) を使用して行った。

2-7-2 蛍光顕微鏡による Mup1-GFP および Mup1-Jen1C-GFP の局在観察

Mup1-GFP および Mup1-Jen1C-GFP 発現プラスミドを保持する菌株を用いて、2-6 に従って Mup1 および Mup1-Jen1C の発現を誘導した。その後、500 μ L の培養液を 1.5 mL サンプルチューブにとり $2,300 \times g$ で 1 分間遠心し、上清を約 450 μ L 除き、残りの 50 μ L の培地に菌体を懸濁したものを観察に用いた。

メチオニンを添加して、Mup1 および Mup1-Jen1C の分解を観察する場合には、SRaff-Met 培地で 3 時間培養した後、終濃度が 20 mg/L となるようにメチオニンを加え、一定時間ごとにサンプリングし観察に用いた。

また、グルコースを添加して Mup1 および Mup1-Jen1C の分解を観察する場合には、SLac-Met 培地で 3 時間培養した後、終濃度が 2% となるようにグルコースを加え、一定時間ごとにサンプリングし観察に用いた。

Mup1-GFP の局在解析はデジタルカメラ ORCA-Flash2.8 (浜松ホトニクス) および解析ソフトウェア MetaMorph (Molecular Devices) を搭載した蛍光顕微鏡 IX71 (OLYMPUS) を使用して行った。

2-8 全細胞タンパク質の抽出 (Mup1-GFP および Mup1-Jen1C-GFP)

pMup1-GFP および pMup1-Jen1C-GFP を保持した酵母細胞を第一章 2-12 に従って

Mup1 の発現を誘導した。メチオニンまたはグルコースを添加して Mup1 および Mup1-Jen1C の分解を観察する場合には、終濃度が 20 mg/L となるように高濃度のメチオニン (2 g/L) を適当量加えた。直後に菌密度を測定し、一定時間ごとにサンプリングした。TCA 法 (第一章 2-13 参照) で全細胞タンパク質を調製し、ウェスタンブロット法により残存 Mup1 および Mup1-Jen1C 量を解析した (以下メチオニン・チェイス法と呼称する)。

グルコースを添加して Mup1 および Mup1-Jen1C の分解を観察する場合には、第一章 2-13 のグルコース・チェイス法に従った。

2-9 ウェスタンブロッティングによる標的タンパク質の検出

実験操作は第一章の 2-16 項に従って行った。一次抗体として、ブロッキング溶液で 2,000 倍に希釈したマウス抗 GFP 抗体 (Moab(mFX75)、和光純薬) 液中に転写膜を移し、室温で一時間浸透した (一次抗体反応)。また、ローディングコントロールとして 3-Phosphoglycerate kinase(PGK)を検出するために、マウス抗 PGK 抗体 (Clone 22C5D8、Invitrogen) を 200,000 倍希釈して使用した。二次抗体として、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識のヤギ抗マウス IgG 抗 (BioRad) を用いた。

Table 6 Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
BY4742	<i>MATα</i> ; <i>ura3Δ0</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>lys2Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> (1)
<i>jen1Δ</i>	BY4742; <i>jen1Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
<i>rod1Δ</i>	BY4742; <i>rod1Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
<i>ldb19Δ</i>	BY4742; <i>ldb19Δ::KanMX</i>	Open Biosystems

Table 7 Oligonucleotides used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
KM14	TATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGTCACTTCGGCTCCGTAAGCC
KM15	ATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTCAGCGATTTTCTTGTTAC
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 Rv	CAGGAAACAGCTATGAC
SHO58	TCTAGAACTAGTGGATCATGTCGGAAGGAAGAACG
SHO109	GCTGGGTGGATCCTCAGTGAAGATGATTGATTCGA
SHO110	CACTGAGGATCCACCCAGCGATTTTCTTGTTAC
SHO144	GGCGAATTGGAGCTCGGGCATCAGAGTATATACCC
SHO145	TCCACTAGTTCTAGAATTTTCAGTAGCAGTATTTA
SHO220	TCTTCTACTACGCGTCGGGAAGTAAGTAACTCGACAG
SHO221	TCCCGACGCGTAGTAGAAGAAGAAAATTGATAGTTCT
SHO224	AGGATGATTGATTTCGAACGTCTCGAGGACATATGAGGAGCATATTGAG
SHO225	CTCGAGACGTTTCGAATCAATCATCCTCACTGAAGCACATTCCG

Table 8 Plasmids used in this study

Plasmid name	Genotype	Reference or source
pRS316	<i>CEN, URA3</i>	Sikorski and Hieter (2)
pRS316-GFP-ADHt	<i>CEN, URA3, GFP-T_{ADH1}</i>	Laboratory stock
pSF3	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-JEN1-GFP</i>	This study (第 1 章)
pSF24	<i>CEN, URA3, P_{MUP1}-MUP1-GFP</i>	This study
pSF35	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-H612A,I613A,E614A-GFP</i>	This study (第 1 章)
pSF43	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-MUP1-GFP</i>	This study
pSF44	<i>CEN, URA3, P_{MUP1}-MUP1-JEN1(597-616)-GFP</i>	This study
pSF45	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-MUP1-JEN1(597-616)-GFP</i>	This study
pSF47	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-MUP1-jen1(597-616, H612A/I613A/E614A)-GFP</i>	This study
pSF50	<i>CEN, URA3, P_{MUP1}-mup1-K27R,K28R-GFP</i>	This study
pSF51	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-mup1-K27R,K28R-GFP</i>	This study
pSF52	<i>CEN, URA3, P_{MUP1}-mup1-K27R,K28R-JEN1(597-616)-GFP</i>	This study
pSF53	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-mup1-K27R,K28R-JEN1(597-616)-GFP</i>	This study
pSF54	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-jen1-K599R,K607R -GFP</i>	This study
pSF55	<i>CEN, URA3, P_{JEN1}-MUP1-jen1(597-616, K599R,K607R)-GFP</i>	This study

Table 9. DNA fragments used for in vivo assembly of plasmids.

Plasmid		PCR product used for in vivo assembly			Plasmid used for in vivo assembly
		Forward primer	Reverse primer	Template DNA	
pMup1-GFP (pSF24)	Fragment 1	KM14	KM15	genomic DNA	<i>SacI/BamHI</i> -digested pRS316-GFP-ADHt
pJEN1p-Mup1-GFP (pSF43)	Fragment 1	SHO144	SHO145	genomic DNA	<i>SacI/BamHI</i> -digested pRS316-GFP-ADHt
	Fragment 2	SHO58	KM15	genomic DNA	
pMup1-Jen1(597-616)-GFP (pSF44)	Fragment 1	M13 Fw	SHO110	pSF24	<i>BamHI/HindIII</i> -digested pRS316
	Fragment 2	SHO109	M13 Rv	pSF3	
pJEN1p-Mup1-Jen1(597-616)-GFP (pSF45)	Fragment 1	M13 Fw	SHO110	pSF43	<i>BamHI/HindIII</i> -digested pRS316
	Fragment 2	SHO109	M13 Rv	pSF3	
pMup1(K27R,K28R)-GFP (pSF50)	Fragment 1	M13 Fw	SHO221	pSF24	<i>BamHI/HindIII</i> -digested pRS316
	Fragment 2	SHO220	M13 Rv	pSF24	
pJEN1p-Mup1(K27R,K28R)-GFP (pSF51)	Fragment 1	M13 Fw	SHO221	pSF43	<i>BamHI/HindIII</i> -digested pRS316
	Fragment 2	SHO220	M13 Rv	pSF43	
pJEN1p-Mup1-Jen1(597-616, H612A,I613A,E614A)-GFP (pSF47)	Fragment 1	M13 Fw	SHO110	pSF43	<i>BamHI/HindIII</i> -digested pRS316
	Fragment 2	SHO109	M13 Rv	pSF35	
pMup1(K27,28R)-Jen1(597-616)-GFP (pSF52)	Fragment 1	M13 Fw	SHO221	pSF44	<i>BamHI/HindIII</i> -digested pRS316
	Fragment 2	SHO220	M13 Rv	pSF44	
pJEN1p-Mup1(K27R,K28R)-Jen1(597-616)-GFP (pSF53)	Fragment 1	M13 Fw	SHO221	pSF45	<i>BamHI/HindIII</i> -digested pRS316
	Fragment 2	SHO220	M13 Rv	pSF45	
pJEN1p-Mup1-Jen1(K599R,K607R)-GFP (pSF55)	Fragment 1	M13 Fw	SHO225	pSF45	<i>BamHI/HindIII</i> -digested pRS316
	Fragment 2	SHO224	M13 Rv	pSF45	

REFERENCES

1. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132
2. Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27

3. 結果

3-1 Jen1 のグルコース依存的な分解は基質との結合による構造変化を必要としない

第一章では、乳酸を単一炭素源とする培地で酵母株を培養することにより Jen1 の発現を誘導し、その培養液に直接グルコースを添加して Jen1 のグルコース不活性化を観察した。この条件では、乳酸の Jen1 への結合がコンフォメーション変化をもたらし、それが引き金となって Rod1 との会合が生じる可能性を否定できない。そこで、Jen1 の輸送基質とならないラフィノースまたはグリセロール/エタノールを炭素源として酵母株を培養して Jen1 を誘導し、その後のグルコース不活性化が起こるか検証することとした。

本実験では、*jen1Δ*株をプラスミド pRS316-JEN1-GFP-ADH1t で形質転換したものを解析に使用した。Jen1-GFP は *JEN1* プロモーター支配下で発現するようにデザインされた。この株をラフィノース (SRaff 培地) やグリセロール、エタノール (SGE 培地) を炭素源とした条件下で培養することで Jen1 の発現を誘導した。因みに、*JEN1* プロモーターはラフィノースやグリセロール/エタノール存在下で活性を持つことが報告されている (Chambers *et al.*, 2004)。蛍光顕微鏡観察の結果、SRaff 培地および SGE 培地で培養した時、いずれの条件下でも Jen1-GFP は原形質膜上に局在していた (Figure 14)。その後、グルコースの添加によってグルコース・チェイス解析を行ったところ、いずれの条件下でも Jen1-GFP はすばやく原形質膜から取り込まれ、液胞へ輸送されていた (Figure 14)。以上より、輸送基質非存在下でも Jen1 は分解されたことから、グルコース (シグナル) 誘導性の Jen1 分解には基質輸送に伴う構造変化を必要としないことが示唆された。

3-2 Rod1 のグルコース依存的な Jen1 認識には Jen1 の C 末端領域のみで十分である

第一章より、Jen1 の Rod1 による認識には C 末端領域が必要であることが明らかとされた。そこで、本実験では、Rod1 が Jen1 を認識するためには、Jen1 の C 末端領域のみで十分であるのか、または C 末端領域だけでなくその他の領域も必要であるのか検証した。

高親和性メチオニン輸送体 Mup1 は、メチオニン濃度依存的な分解制御を受けており、過剰なメチオニン存在下では、アダプタータンパク質 Ldb19/Art1 依存的に分解される (Lin *et al.*, 2008)。これまでの報告において、Mup1 の発現誘導はグルコース存在下で行われていることから、Mup1 の分解はグルコースによって誘導されないことが予測される (Lin *et al.*, 2008; Guiney *et al.*, 2016)。そこで、Mup1 に Jen1 の C 末端領域を付加することで、Rod1 による分解制御を受けるか検証した。本実験では、Mup1 の C 末端に Jen1 の C 末端領域 (C 末端 20 アミノ酸 (597-616 アミノ酸残基)) を融合させ

たキメラ輸送体 Mup1-Jen1C-GFP の発現コンストラクトを作製し (Figure 15A)、以下の実験で用いることとした。

3-2-1 Rsp5 アダプタータンパク質遺伝子破壊株における Mup1-GFP および Mup1-Jen1C-GFP の局在とメチオニン濃度依存的なターンオーバー解析

まず、Jen1C を融合したことにより Mup1-GFP と Mup1-Jen1C-GFP のメチオニン濃度依存的な分解に、相違が生じないか確認することにした。本実験では、Mup1-GFP と Mup1-Jen1C-GFP の発現には、高濃度のメチオニン存在下で発現を抑制することができる *MUP1* プロモーターを用いた。すなわち、*MUP1* プロモーター制御下で Mup1-GFP または Mup1-Jen1C-GFP を発現する *ldb19Δ* 株および *rod1Δ* 株をメチオニン、グルコース非存在下 (SRaff-Met 培地) で培養し、その後培養液にメチオニンを添加し蛍光顕微鏡観察に供した。メチオニン未処理区では、いずれの株でも Mup1-GFP と Mup1-Jen1C-GFP の原形質膜上への局在が観察された (Figure 15 B and C; +Met, 0 min)。メチオニンを加えて 60 分後には、*rod1Δ* 株において Mup1-GFP と Mup1-Jen1C-GFP の原形質膜上への局在は消失していた (Figure 15 B; +Met, 60 min)。一方、*ldb19Δ* 株では Mup1-GFP と Mup1-Jen1C-GFP のエンドサイトーシスは著しく遅延していた (Figure 15 C; +Met, 60 min)。これらの結果より、Mup1-Jen1C-GFP は Mup1-GFP と同様に Ldb19 依存的にメチオニン誘導性の分解を受けることが明らかとなった。すなわち、付加した Jen1C 配列は Mup1 のメチオニン誘導性の分解に影響を与えないことが確認された。

Mup1 のメチオニン濃度依存的な分解が Rod1 の制御下にあるのか検証するため、*ROD1* 遺伝子の欠損がメチオニン濃度依存的な Mup1 のターンオーバーに及ぼす影響を解析した。*MUP1* プロモーター制御下で Mup1-GFP を発現する *rod1Δ* 株を SRaff-Met 培地で培養することで Mup1 の発現を誘導した。その後、高濃度のメチオニンを添加し、原形質膜上の Mup1 の局在変化を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、メチオニン添加後、60 分後には完全に原形質膜上の Mup1-GFP は消失していた (Figure 15B)。ゆえに、Mup1 のメチオニン濃度依存的な分解は Rod1 非依存的であることが確認された。さらに、*MUP1* プロモーターの制御下で遺伝子発現が行われるように設計されたプラスミド *pMUP1p-Mup1-Jen1C-GFP* を作製し、*rod1Δ* 株に導入した。SRaff-Met 培地で発現を誘導し、高濃度メチオニン添加後の局在変化を観察したところ、Mup1-Jen1C-GFP もメチオニン濃度依存的に細胞内へと取り込まれた (Figure 15B)。この結果より、Mup1 へ Jen1 の C 末端を付加させても、Mup1 従来のメチオニン濃度依存的な分解制御を受けることが明らかとなった。

次に、作製した Mup1-Jen1C-GFP のメチオニン濃度依存的な分解は、Mup1 と同じくアダプタータンパク質 Ldb19 を介して制御されているのか検証した。そのために、*MUP1p-Mup1-Jen1C-GFP* および *MUP1p-Mup1-GFP* を用いて、*ldb19Δ* 株を形質転換させた。形質転換株を SRaff-Met 培地で培養することで Mup1 や Mup1-Jen1C の発現を誘導した。その後、メチオニンを添加し Mup1 の原形質膜上からの取り込みを経時的に

観察した。局在観察の結果、Mup1-GFP はこれまでの報告と一致し、原形質膜上からの取り込みに大きな遅延が生じていた。また、Mup1-Jen1C-GFP の原形質膜上からの取り込みも遅延していた (Figure 15C)。ゆえに、Mup1-Jen1C のメチオニン濃度依存的な分解は、Mup1 と同様、Ldb19 に制御されていることが明らかとなった。以上の結果より、作製した Mup1-Jen1C キメラ輸送体は、Mup1 が従来持つ分解制御機構を維持していることが示された。

3-2-2 Mup1-Jen1C の局在とグルコース依存的なターンオーバー解析

次に、Mup1 や Mup1-Jen1C のグルコース依存的なターンオーバーの解析を試みた。そのために、Mup1-GFP や Mup1-Jen1C-GFP をグルコースの存在によって遺伝子発現が厳密に抑制される *JEN1* プロモーターを用いて発現させた。乳酸存在下 (グルコース非存在下)、メチオニン非存在下で培養した野生株で、Mup1-GFP や Mup1-Jen1C-GFP は原形質膜上に局在していた (Figure 16A; WT, 0 min)。これらの培養液にグルコースを添加すると、Mup1-GFP は 120 分後も安定して原形質膜上に局在していたが、Mup1-Jen1C-GFP はメチオニンが欠乏状態にあるにも関わらず 120 分後にはほぼ完全に原形質膜上から消失していた (Figure 16A; WT, 120 min)。次に、ウェスタンブロット法によって、Mup1-GFP や Mup1-Jen1C-GFP のメチオニン欠乏下でのグルコース依存的な分解を経時的に解析した。その結果、蛍光顕微鏡を用いた局在観察と一致し、Mup1-Jen1C-GFP はグルコース刺激に応答して分解されることが明らかとなった (Figure 16B)。

次に、Mup1-Jen1C-GFP のグルコース依存的な分解が Rod1 依存的に誘導されたのか検証することとした。そのため、*JEN1* 遺伝子プロモーター制御下で Mup1-Jen1C-GFP を *rod1Δ* 株で発現させ、メチオニン欠乏下でグルコース・チェイス解析を行った。その結果、野生株で見られた Mup1-Jen1C-GFP の原形質膜上からの取り込みや分解が抑制されていた (Figure 16)。この結果から、Rod1 はグルコース刺激に応答して、Mup1-Jen1C を認識することが示唆された。

さらに、Rod1 が Mup1-Jen1C-GFP の Jen1 C 末端領域を認識しているか解析することとした。そこで、Mup1-Jen1C-GFP の Jen1 C 末端領域へ 3A 変異を導入した Mup1-Jen1C(3A)-GFP を野生株で発現させ、メチオニン欠乏下でグルコース添加後の局在観察やグルコース・チェイス解析を実施した。その結果、蛍光顕微鏡観察において、3A 変異体はグルコース添加 120 分後でも原形質膜上に局在していた (Figure 16A)。さらに、ウェスタンブロット法による経時的な分解の解析結果も、局在観察と一致し、グルコース添加後も Mup1-Jen1C(3A)-GFP は安定して存在した (Figure 16B)。この結果は、Rod1 が Mup1-Jen1C-GFP の Jen1C 領域を認識していることを支持するものである。以上の結果より、Rod1 によるグルコース依存的な Jen1 の認識には Jen1 の C 末端領域のみで十分であることが明らかとなった。

3-3 Mup1-Jen1C キメラ輸送体の Rsp5 アダプタータンパク質によるユビキチン化制御

3-2 では、Mup1 の分解はアダプタータンパク質 Ldb19 により基質（メチオニン）濃度依存的に制御されているが、本実験で作製した Mup1-Jen1C キメラ輸送体は Ldb19 制御系と独立して、Rod1 にも依存して分解されることが示された。これまでに Mup1 の基質依存的な分解において、Ldb19 による認識には、少なくとも Mup1 の N 末端領域が必要であることが報告されている (Guiney *et al.*, 2016)。それに対して、3-1 では Mup1-Jen1C のグルコース依存的な分解では、Rod1 がキメラ輸送体の C 末端領域に存在する Jen1 C 配列を認識していることが明らかとされた。これら Rsp5 アダプタータンパク質の役割は、Rsp5 による標的のユビキチン化を仲介することである。本実験では、仲介するアダプターの違いによって Rsp5 による Mup1-Jen1C ユビキチン修飾部位が異なるのか解析することとした。すなわち、Mup1-Jen1C 分解が誘導されるためには、制御系が異なっているにもかかわらず特定の部位へのユビキチン修飾が必要であるのか検証した。

3-3-1 Mup1-Jen1C のメチオニンに応答したユビキチン化

Mup1 のメチオニン濃度依存的な分解において、Mup1 の N 末端領域の 27 番目と 28 番目のリジン残基がユビキチン修飾を受けることが報告されている (Guiney *et al.*, 2016)。そこで、Mup1-Jen1C-GFP の 27 番目と 28 番目のリジン残基をアルギニンに置換した Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP (Figure 17A) を発現させて各種条件における分解様式を解析した。

まず、野生株において Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP を *MUP1* プロモーター制御下で発現させ、メチオニンに応答した分解を解析した。また、対象実験として K27R,K28R 変異を持たない Mup1-Jen1C-GFP、Jen1C 領域を持たない Mup1(K27R,K28R)-GFP と Mup1-GFP を発現する株を用いた実験を並行して行った。SRaff-Met 培地で培養し各種 Mup1-GFP 変異体の発現を誘導した後、メチオニンを添加し、局在観察やメチオニン・チェイス解析を実施した。報告通り、Mup1(K27R,K28R)-GFP のエンドサイトーシスを介した分解は Mup1-GFP と比較して著しく遅延していた (Figure 17B and C)。Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP の分解も Mup1-Jen1C-GFP のそれと比較して著しく遅延した (Figure 17B and C)。このことは Jen1C 領域の有無に関わらず Mup1 のメチオニン誘導性分解は K27R,K28R 変異によって抑制されることを示している。次に、Mup1-Jen1C-GFP のメチオニン添加に応答したユビキチン化を解析した。すなわち、各種 Mup1 変異体を *vrp1Δ* 株で発現させ、ウェスタンブロッティング法で移動度の減少を検出することでユビキチン化を評価した (第一章 3-2-1 参照)。Mup1-GFP や Mup1-Jen1C-GFP はメチオニン添加後、ユビキチン修飾による分子量の増大が認められた。一方で、Mup1(K27R,K28R)-GFP や Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP 発現株では、ユビキチン修飾による分子量の増加が著しく抑制されていた (Figure 17D)。これらの結果より、Ldb19-Rsp5 複合体による Mup1-Jen1C のメチオニン濃度依存的なユビキチン修飾は、Mup1 と同様、Mup1 の N 末端領域中の 27 番目と 28 番目のリジン残基が標的

とされていることが示唆された。

3-3-2 Mup1-Jen1C のグルコースに応答したユビキチン化

次に、Mup1-Jen1C-GFP の Rod1 を介したグルコース依存的な分解において、27 番目と 28 番目のリジン残基のユビキチン化が必要か検証した。すなわち、Mup1(K27R,K28R)-GFP および Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP を *JEN1* 遺伝子プロモーター制御下 SLac-Met 培地で野生株において発現させ、グルコース添加後の局在観察を行った。その結果、Mup1-GFP の分解は元来グルコース非制御にあるため、アルギニン置換変異を導入しても、グルコース添加後も安定して原形質膜上に局在していた。それに対して、Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP は、グルコース依存的に細胞内へ取り込まれ、分解された (Figure 18B)。さらに、これらの変異体を *vrp1Δ* 株で発現させ、グルコース・チェイス解析を実施することで、アルギニン置換変異体のグルコース依存的なユビキチン修飾を解析した。SLac-Met 培地でアルギニン置換変異体の発現を誘導し、グルコースを添加したところ、Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP はユビキチン修飾による分子量増加が検出された。一方で、グルコース非制御下の Mup1-GFP やそのアルギニン置換変異体では、グルコース依存的なユビキチン化は認められなかった (Figure 18C)。これらの結果より、Rod1 を介したグルコース依存的な Mup1-Jen1C-GFP のユビキチン化は、Ldb19 を介したメチオニン依存的なユビキチン化とは異なる領域が標的となっていることが明らかとなった。

そこで、Rod1 およびグルコース依存的な Mup1-Jen1C-GFP のユビキチン化部位を明らかにすることとした。Mup1 へ付加させた Jen1 の C 末端領域に存在する 2 つのリジン残基 (Jen1 のアミノ酸配列の 599 番目と 607 番目の残基に相当) に着目した。これら 2 つのリジン残基がユビキチン修飾に必要であるのか検証するため、この 2 残基をアルギニンに置換した変異体 (Mup1-Jen1C(K599R,K607R)-GFP; Figure 18A) の発現コンストラクトを作製し、野生株や *vrp1Δ* 株で発現させ、解析に用いた。*JEN1* 遺伝子プロモーターによって Mup1-Jen1C(K599R,K607R)-GFP を野生株に発現させ、局在観察やグルコース・チェイス解析を行なったところ、グルコース添加 120 分後も原形質膜上にて蛍光シグナルが検出された (Figure 18B)。すなわち、Mup1-Jen1C(K599R,K607R) 変異体のグルコース依存的な分解は Mup1-Jen1C よりも著しく遅延することが明らかとなった。さらに、*vrp1Δ* 株を用いてグルコース・チェイス解析を実施することで、Mup1-Jen1C(K599R,K607R)-GFP 変異体のグルコース依存的なユビキチン修飾を解析した結果、Mup1-Jen1C-GFP や Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP で見られた、ユビキチン化されたことにより生じる高分子量側へのバンド移動は検出されなかった (Figure 18C)。以上の結果より、Mup1-Jen1C-GFP のグルコース依存的な Rod1 支配下のユビキチン修飾は、キメラ輸送体の Jen1 の C 末端領域中の 2 つのリジン残基が標的となることが示唆された。

以上の結果より、仲介するアダプターの違いによって Rsp5 による Mup1-Jen1C ユビキチン修飾部位が異なることが明らかとなった。また、本実験結果より膜タンパク質

のエンドサイトーシスには必ずしも特定のユビキチン化が必要ではないことが示唆された。

3-4 Jen1 の C 末端領域はグルコース依存的にユビキチン化される

3-3 の実験により、キメラ輸送体 Mup1-Jen1C のグルコース依存的な分解において、Jen1C 領域中の 2 つのリジン残基がユビキチン化されていることが示唆された。本実験では、これら 2 つのリジン残基 (Lys⁵⁹⁹, Lys⁶⁰⁷) が Jen1 の Rod1 を介したグルコース依存的なユビキチン化においても必要な部位であるか検証した。

Jen1 の 599 番目と 607 番目のリジン残基をそれぞれアルギニンに置換した Jen1(K599R,K607R)-GFP を *jen1Δ* 株で発現させ、グルコース添加後の Jen1 変異体の分解を局在観察やグルコース・チェイスによって解析した。その結果、Jen1(K599R,K607R)-GFP では分解が著しく遅延した (Figure 19A and B)。そこで、この分解遅延がこれらリジン残基へのユビキチン化の阻害によるものなのか検証するため、Jen1 変異体を発現する *vrp1Δ* 株に対するウェスタンブロット解析を行った。その結果、Jen1(K599R,K607R)-GFP では、野生型の Jen1 で見られるようなユビキチン化による分子量の増加が著しく抑制されていた (Figure 19C)。この結果より、Jen1 の C 末端領域中に存在する 599 番目と 607 番目のリジン残基は、グルコースに応答したユビキチン化重要な残基であることが明らかとなった。

以上の結果より、Jen1 の C 末端領域はグルコース依存的に Rod1 により認識され、Rod1-Rsp5 複合体依存的なユビキチン修飾を受けると予想した。ゆえに、本実験を通して、Jen1 の C 末端領域はグルコース依存的な分解調節領域 (degron) として機能すると結論付けた。

4 考察

近年の報告では、輸送体の基質濃度依存的な分解において、アダプター-Rsp5 複合体の認識領域やユビキチン修飾部位を含む分解調節領域がアダプターによって認識されるためには、輸送基質の取り込みに伴う輸送体の構造変化が必要であるというモデルが提案されている (Cain and Kaiser, 2011; Keener and Babst, 2013; Ghaddar *et al.*, 2014; Guiney *et al.*, 2016)。しかしながら、本章の解析を通して Jen1 のグルコース依存的な分解では、この基質濃度依存的な分解制御とは異なり、自身の基質の存在やその取り込みを必要とせず、シグナル依存的に誘導されることが明らかとなった。さらに、Jen1 の C 末端領域は、グルコースシグナルおよび Rod1 依存的（輸送基質非依存的）な輸送体のエンドサイトーシスを誘導するために必要十分な領域、すなわち degron として機能することを明らかとした。

・ Jen1 の輸送基質依存的な構造変化とグルコース依存的な分解

本章では、輸送基質以外の非発酵性炭素源存在下（ラフィノースやグリセロール/エタノール）で発現された Jen1-GFP がグルコースの添加によって正常に分解されることが確認された (Figure 14)。すなわち、Jen1 のグルコース依存的なエンドサイトーシスは輸送基質とは無関係に誘導されることが明らかとなった。

さらに、Mup1 に Jen1 の C 末端領域を移植したところ、このキメラ輸送体は Rod1 およびグルコース依存的な分解制御を獲得した (Figure 16)。この結果より、Jen1 のコアドメインがなくとも、Jen1 の C 末端領域を Rod1 が認識できることから、グルコース不活性化には Jen1 の輸送体コアドメイン中の特定の領域を必要としないことが示唆された。また、この分解は Mup1 の輸送基質であるメチオニン非存在下でも誘導される。現在提唱されている Mup1 の分解制御機構のモデル (Guiney *et al.*, 2016)に従うと、本研究で用いた Mup1-Jen1C は基質取り込み依存的な立体構造の変化が起きない条件下（メチオニン欠乏状態）でも、基質以外のシグナル入力（グルコース添加）によってエンドサイトーシスされていることになる。つまり、Rod1 は基質依存的な細胞質領域の構造変化を必要とせずに Jen1 の C 末端領域を認識していると考えられる。

これを可能にしている要因の一つとして、Rod1 の認識領域の局在場所が挙げられる。第一章により、Rod1 の認識には Jen の C 末端に非常に近い His⁶¹²、Ile⁶¹³、Glu⁶¹⁴ の 3 残基が重要であることが明らかとされた。すなわち、Rod1 の Jen1 認識領域が、Jen1 のコアドメインから遠く離れた場所に位置し、かつ細胞質ループ等輸送体中の他の領域を必要としないことから、Rod1 は容易に標的となる Jen1 C 末端へとアクセスできると予想される (Figure 20)。このような degron 認識機構は Jen1-Rod1 間だけでなく、これまでの報告から、高親和性アミノ酸輸送体 Gap1 の degron においても同様の性質を示していると考えられる。Gap1 は過剰な基質によって分解される一方で、窒素源として好んで利用されるアンモニウムによるカタボライト不活性化も受ける。細胞へのアンモニウムの取り込みは、TOR (target of rapamycin)複合体 1 (TORC1)キナーゼを活性化

し (Merhi and Andre, 2012; Ghaddar *et al.*, 2014)、その下流の因子であり Bul アダプターのリン酸化を担う Npr1 キナーゼが不活性化し、Sit4 ホスファターゼが活性化することで、Rsp5 アダプター-Bul1 および Bul2 は脱リン酸化状態となる。脱リン酸化により活性化された Bul1/2 は、Gap1 のコアドメインから遠方にある N 末端領域を認識して、その近傍の 9 番目および 16 番目のリジン残基をユビキチン化する (Merhi and Andre, 2012; Ghaddar *et al.*, 2014)。基質輸送活性が阻害された Gap1 変異体も上述の TORC1 シグナル伝達経路が活性化されることで分解される (Ghaddar *et al.*, 2014)。すなわち、Gap1 の TORC1 活性化依存的なエンドサイトーシスには、輸送基質依存的な構造変化が必要でないことが考えられている。これらの報告は、Jen1 のシグナル依存的な分解における Rod1 の認識機構を支持するものである。ゆえに、これらの結果を通して、原形質膜輸送体の基質非依存的なエンドサイトーシスは、輸送体のコアドメインから離れた領域に位置する degron をアダプタータンパク質が利用することで、輸送体の構造変化に依存せずユビキチン修飾が行われるという機構を提唱したい。

また、Rod1 は Jen1 のような原形質膜輸送体だけでなく、 α -フェロモン受容体 Ste2 のリガンド誘導性の Rsp5 依存的なエンドサイトーシスにも必要であることから (Alvaro *et al.*, 2014)、Rod1 による Jen1 と Ste1 の制御を比較した。Alvaro らにより、Ste2 の C 末端 135 残基は *in vitro* で Rod1 と相互作用することが示されている。G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である Ste2 は α -フェロモンとの結合により、C 末端領域のリン酸化を誘導することで構造変化を起こし、細胞質に C 末端領域を暴露する。近年の報告では、リガンド (α -フェロモン) によって誘導されるエンドサイトーシスのシグナル配列の認識には、リガンドとの結合で誘導される Ste2 の構造変化は必要ないことが示唆されている (Chang *et al.*, 2014)。ゆえに、Rod1 との結合にはコアドメイン中のループ領域などは必要としないという点やエンドサイトーシスの誘導に構造変化が必要とされない点では、Jen1 の degron 認識と共通しているといえる。このことから、シグナル伝達依存的なアダプターによる膜タンパク質の degron 認識機構は、輸送体のみならず、受容体にも適応される可能性が考えられる。そのため、Ste2 において Rod1 依存的な degron の同定を進めるだけでなく、他の受容体のアダプター依存的な分解機構の解明が進められることで、受容体分解と輸送体分解の共通点や特異性が一般化されることが期待される。

一方で、Jen1 の N 末端領域に関しては、アダプターが輸送基質依存的な機構により認識していると予想される。近年、Talaia らによって、輸送活性が欠損した Jen1 変異体が、グルコース依存性 (すなわち、Rod1 依存性) エンドサイトーシスによって分解されるが、Bul1/2 依存性エンドサイトーシスに耐性であることを示されている (Talaia *et al.*, 2017)。すなわち、Bul1/2 が Jen1 を認識するためには Jen1 の基質輸送依存的な構造変化を必要とすることを示唆している。本博士論文の第一章において、Bul1/2 が Jen1 の N 末端領域を認識していることを示唆している。ゆえに、Fur4 や Mup1 と同様、Jen1 の N 末端領域にも基質結合に伴う構造変化によって暴露される degron が存在し、それが Bul1/2 によって認識されることが予想される。今後は、Jen1 の Bul1/2 依存的な不活

性化の機構の理解するために N 末端 degron が同定されることが期待される。

・ Jen1 の C 末端 degron を介したユビキチン化

本章の解析によって、Jen1 の Lys⁵⁹⁹ および Lys⁶⁰⁷ 残基をアルギニンに置換することで Jen1 のグルコース依存的なユビキチン化が抑制されることが示された。Mup1 のメチオニン依存的な分解では、Ldb19-Rsp5 複合体は N 末端領域を認識し、その N 末端領域中に存在するリジン残基をユビキチン化していることが報告されている。また、高親和性アミノ酸輸送体 Gap1 のアンモニウム誘導性の分解では、その N 末端領域中に分解に重要な領域が存在し、かつその近傍のリジン残基がユビキチン化されていると考えられている (Soetens *et al.*, 2001; Merhi *et al.*, 2011)。これらの報告から、アダプター認識部位とユビキチン修飾を受けるリジン残基は近傍に存在していることが予想される。よって、Rod1-Rsp5 複合体は、His⁶¹²-Ile-Glu 配列を認識し、隣接する Lys 残基をユビキチン化している、または、Lys 残基を His⁶¹²、Ile⁶¹³、Glu⁶¹⁴ とともに認識し、さらに、それらリジン残基をユビキチン化していると考えられる。しかし、実際にユビキチン化されているかどうかは現時点で不明である。第一章でも述べたが、Jen1 のループ領域中の 338 番目のリジン残基をアルギニン置換することで Jen1 のグルコース依存的な分解が遅延したという報告がされている (Paiva *et al.*, 2009)。それゆえ、Rod1-Rsp5 複合体は Jen1 C 末端を認識し、近傍のリジン残基ではなく、上述のループ領域中のリジン残基をユビキチン化している可能性も考えられる。

また、非常に興味深いことに、Mup1-Jen1C キメラ輸送体はメチオニン濃度依存的なユビキチン修飾を阻害しても (K27R, K28R 置換変異)、Rod1 およびグルコース依存的にユビキチン化され、分解された (Figure 18)。Jen1 と同様、Mup1-Jen1C のグルコース依存的なユビキチン化は Jen1 C 末端のリジン残基が修飾されているのか、もしくはその他のリジン残基が修飾されているのかは不明である。しかし、本研究を通して、少なくともユビキチン化部位は仲介するアダプターによって異なること、膜タンパク質のエンドサイトーシスには必ずしも特定のユビキチン化が必要ではないことが示唆された。また、上述のようなキメラ輸送体でなくとも、Gap1 や Lyp1、Tat2、Fur4、Jen1、Hxt6 など、いくつかの輸送体の分解では複数のアダプターが分解に関与しており、シグナルの違いで異なるアダプターが機能していることが報告されている (Lin *et al.*, 2008; Nikko and Pelham, 2009; Talaia *et al.*, 2017)。さらに、Gap1 ではアンモニウム誘導性とラパマイシン依存的な分解において異なったアダプタータンパク質 (アンモニウム; Bul1/2、ラパマイシン; Aly1/2 および Bul1/2) が機能しており、Aly1/2 依存的な制御では 16 番目のリジン残基のみユビキチン化され、Bul1/2 依存的な制御では 9 番目と 16 番目のリジン残基がユビキチン修飾を受けることが報告されている (Crapeau *et al.*, 2014)。すなわち、仲介するアダプターによってユビキチン修飾部位が異なることが示唆されている。Jen1 では、グルコースだけでなく、乳酸の取り込み依存的な分解、シクロヘキシミドやラパマイシンによる処理誘導性の分解において Bul アダプターが機能することが報告されている (Hovsepian *et al.*, 2018)。そのため、Jen1 のユビキチン化で

も、アダプターの違い（Rod1 と Bul1/2）、分解シグナルの違い（グルコース、輸送基質、または薬剤や環境ストレス）によってユビキチン修飾部位が異なる可能性が予想される。今後、Jen1 や Mup1-Jen1C のグルコース依存的なユビキチン化部位を質量分析法などで明らかにすることで、アダプターによる認識とそれに伴うユビキチン修飾の一般化、もしくは仲介するアダプターの違いによる Rsp5 依存的なユビキチン修飾の特徴づけることができ、アダプターを介したユビキチン付加の総合的な理解に繋がることが期待される。

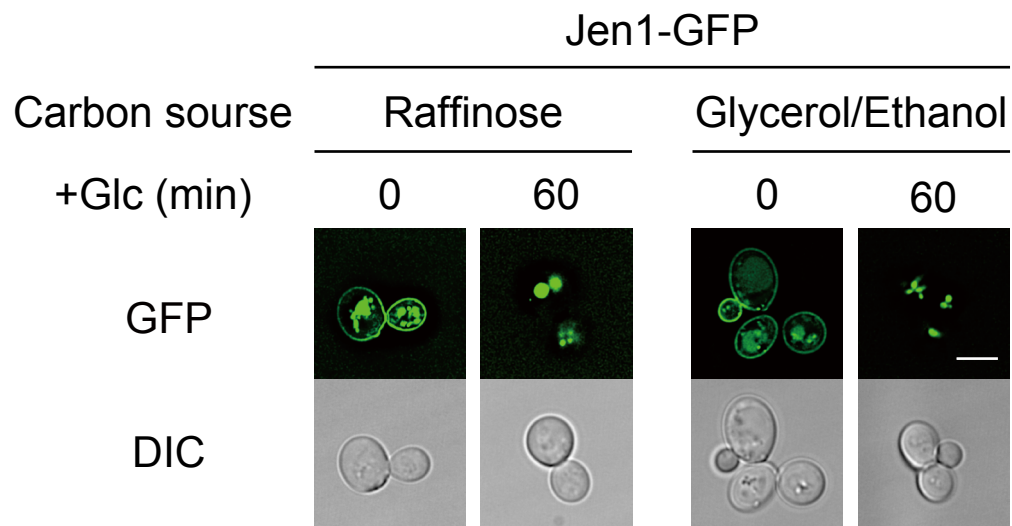


FIGURE 14. Glucose-induced endocytosis of Jen1 occurs even in the absence of its substrates. The *jen1* Δ cells harboring pJen1-GFP was grown in HC medium to an early log phase, and then transferred to HC(Raf) or HC(EG) medium. After 4 h incubation, glucose (a final concentration of 2%) was added to the culture to chase localization shift of GFP-fused Jen1. Subcellular localization of Jen1-GFP was observed by fluorescence microscopy. The scale bar indicates 5 μ m.

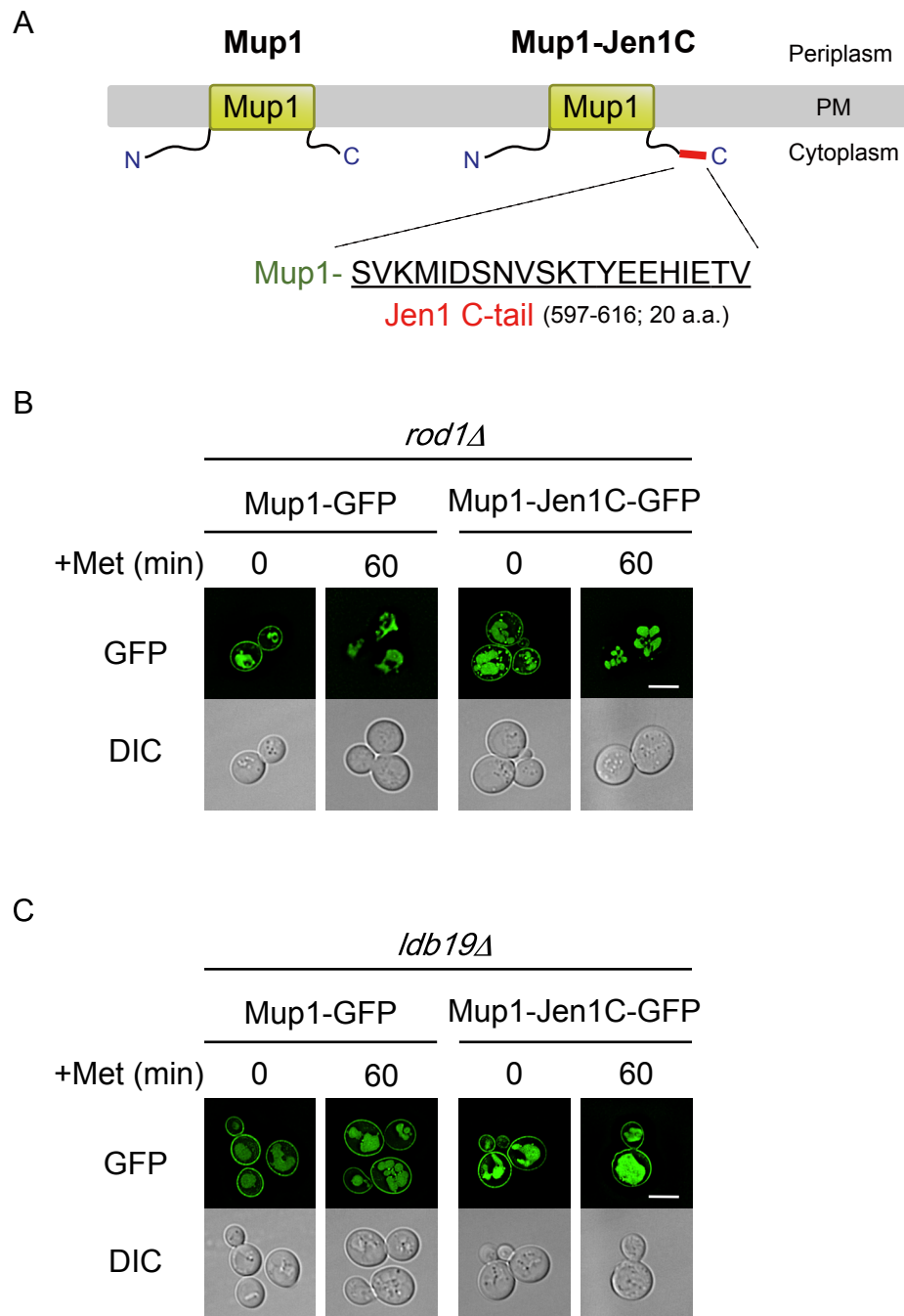


FIGURE 15. Methionine-induced internalization of Mup1–JenC was dependent on Ldb19, but not Rod1. *A*, Schematic depictions of Mup1 and Mup1–Jen1C. The C-terminal 20-amino-acid region (Jen1 C-tail) was fused to the C-terminus of Mup1. *B* and *C*, The *rod1Δ* (*B*) or *ldb19Δ* (*C*) cells expressing Mup1–GFP (pSF24) or Mup1–Jen1C–GFP (pSF44) under the control of the *MUP1* promoter were grown in HC medium to an early log phase, and then transferred to HC(Raf) medium lacking methionine. After 3 h incubation, methionine (a final concentration of 0.002%) was added to the culture to chase localization shift of GFP-fused proteins. Subcellular localization of Mup1–GFP or Mup1–Jen1C–GFP was observed by fluorescence microscopy. The scale bar indicates 5 μ m.

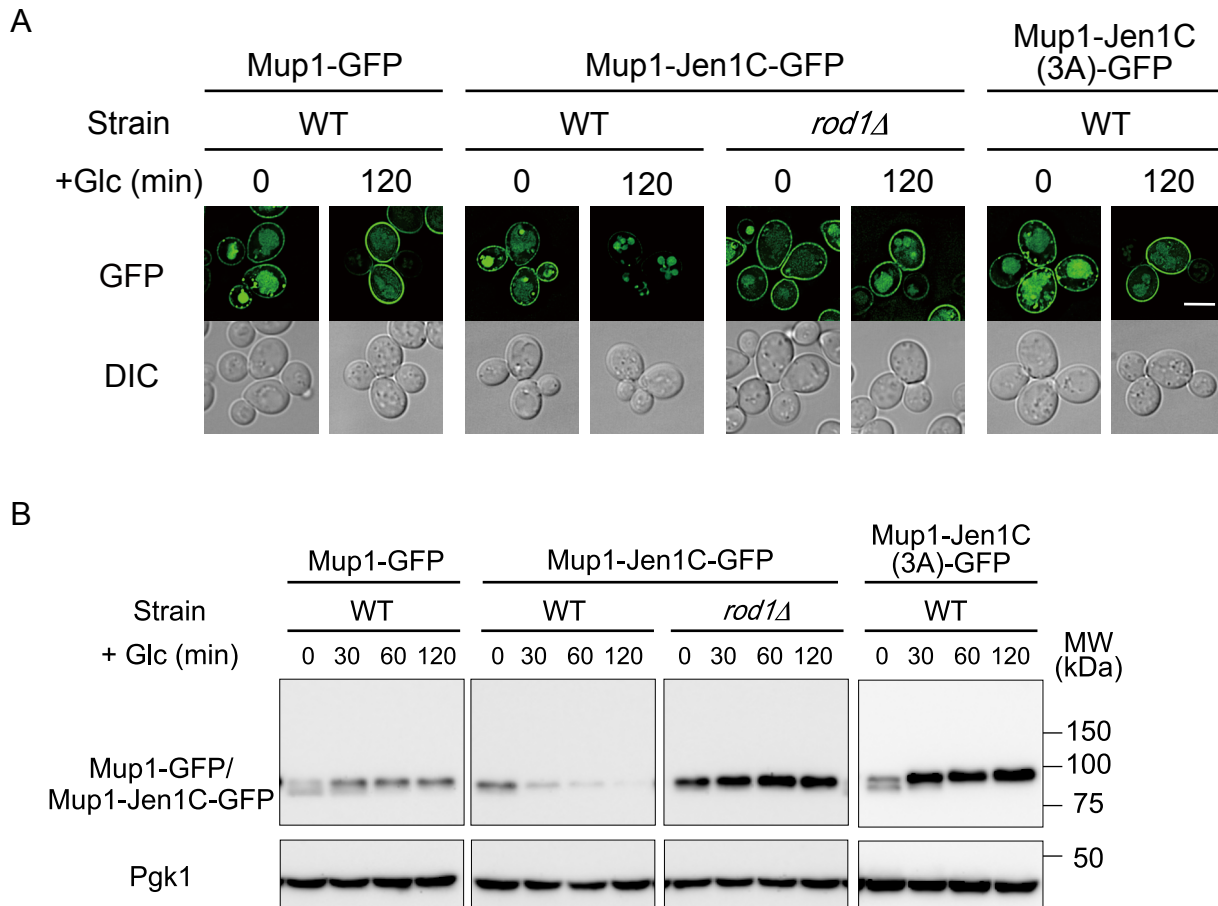


FIGURE 16. Transplanting the Jen1 C-tail to Mup1 leads to Rod1-dependent endocytosis of Mup1. *A* and *B*, The wild-type (WT) or *rod1Δ* cells expressing Mup1-GFP (pSF43), Mup1-Jen1C-GFP (pSF45), or Mup1-Jen1C(3A)-GFP (pSF47) under the control of the *JEN1* promoter were grown in HC medium to an early log phase, and then transferred to HC(Lac) medium lacking methionine. After 3 h incubation, glucose was added to the culture to chase localization shift (*A*) and degradation (*B*) of GFP-fused proteins. Subcellular localization of Mup1-GFP or Mup1-Jen1C-GFP was observed by fluorescence microscopy. The scale bar indicates 5 μ m. Degradation of GFP-fused proteins was monitored by immunoblot analysis using an anti-GFP antibody.

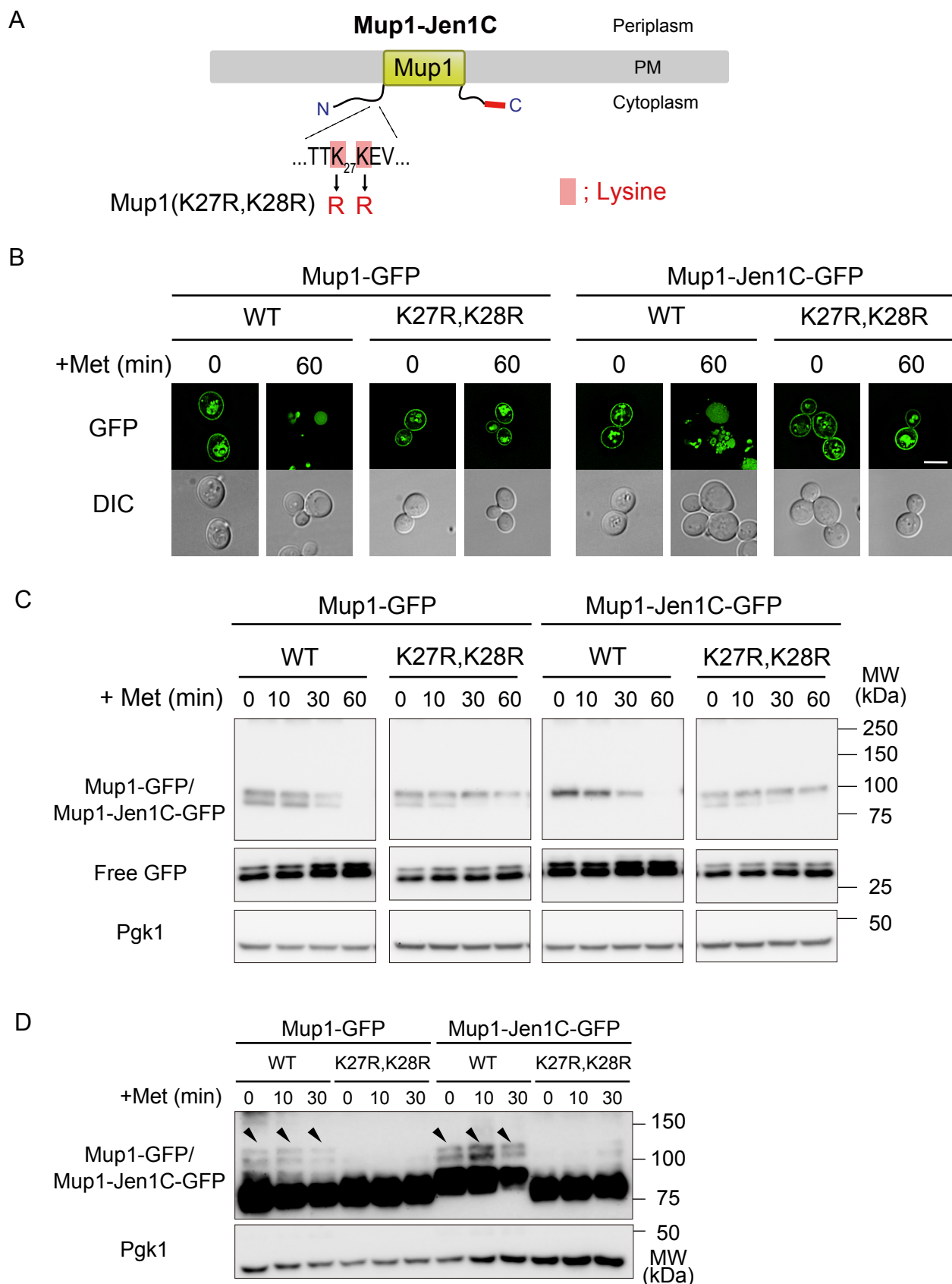


FIGURE 17. Ubiquitination at the Lys²⁷ and Lys²⁸ residues of Mup1-Jen1C is required for its methionine-induced endocytosis. *A*, Schematic depiction of Mup1-Jen1C. Lysine residues that replaced arginine are highlighted. *B* and *C*, The wild-type cells expressing Mup1-GFP, Mup1-Jen1C-GFP, Mup1(K27R,K28R)-GFP (pSF50), or Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP (pSF52) under the control of the *MUP1* promoter were grown as described in Fig. 14 and analyzed by fluorescence microscopy (*B*) and immunoblot (*C*). The scale bar indicates 5 μ m. *D*, The *vrp1* Δ cells expressing Mup1-GFP, Mup1-Jen1C-GFP, Mup1-Jen1C-GFP or Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP from the *MUP1* promoter were grown as described in Fig. 14 and analyzed by immunoblot as described in Fig. 2B. Arrow heads indicate ubiquitinated species.

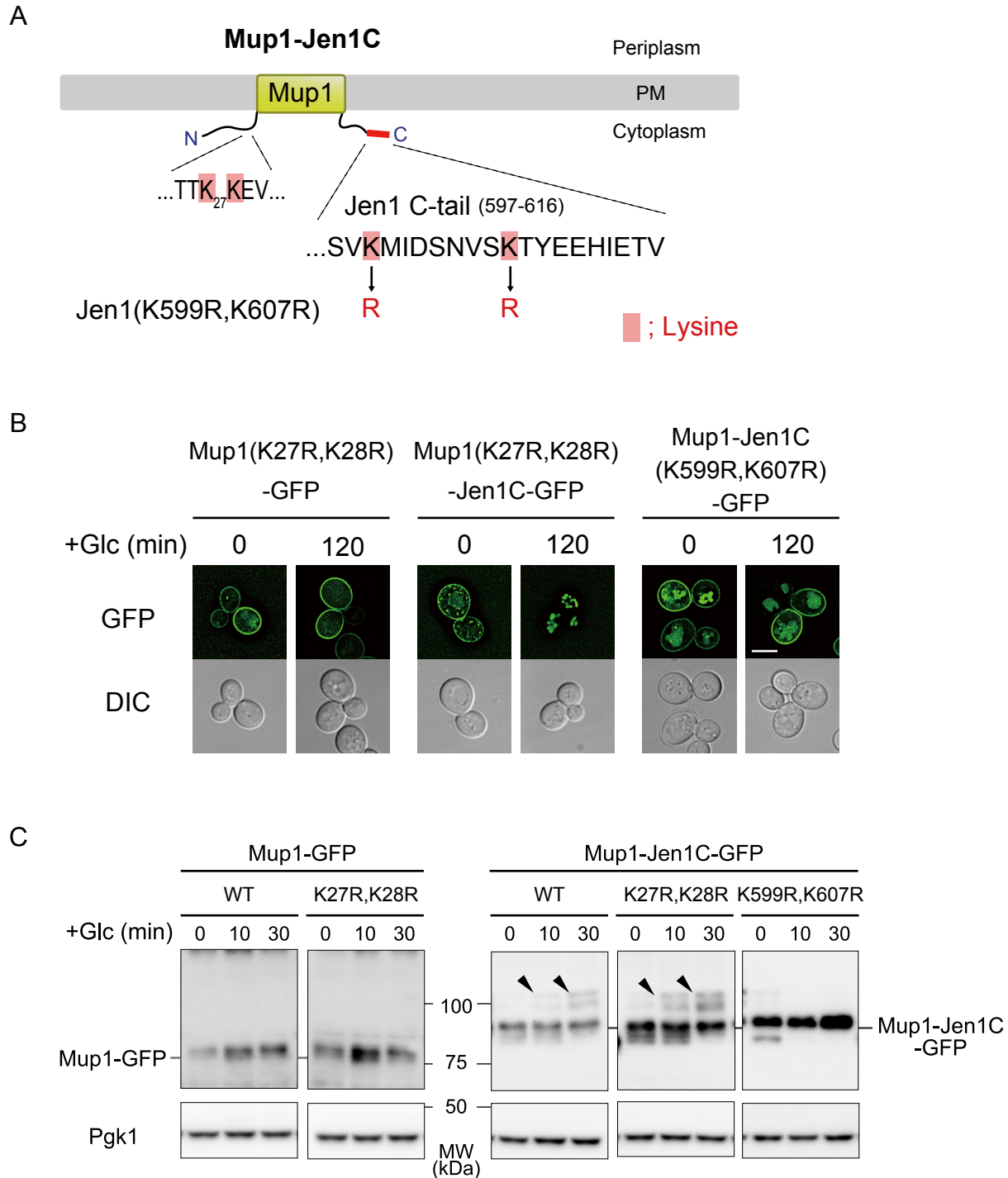


FIGURE 18. Lysine residues in the Jen1 C-tail are important for Rod1-dependent ubiquitination of Mup1-Jen1C. *A*, Schematic depiction of Mup1-Jen1C. Lysine residues that replaced arginine are highlighted. *B*, Internalization of Mup1(K27R,K28R)-GFP (pSF51), Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP (pSF53), and Mup1-Jen1C(K599R,K607R)-GFP (pSF55) expressed from the *JEN1* promoter in wild-type cells was analyzed as described in Fig. 16. The scale bar indicates 5 μ m. *C*, Protein extracts of *vrp1* Δ cells expressing Mup1-GFP, Mup1(K27R,K28R)-GFP, Mup1-Jen1C-GFP, Mup1(K27R,K28R)-Jen1C-GFP, or Mup1-Jen1C(K599R,K607R)-GFP from the *JEN1* promoter were grown as described in Fig. 16 and analyzed by immunoblot as described in Fig. 2B. Arrowheads indicate ubiquitinated species.

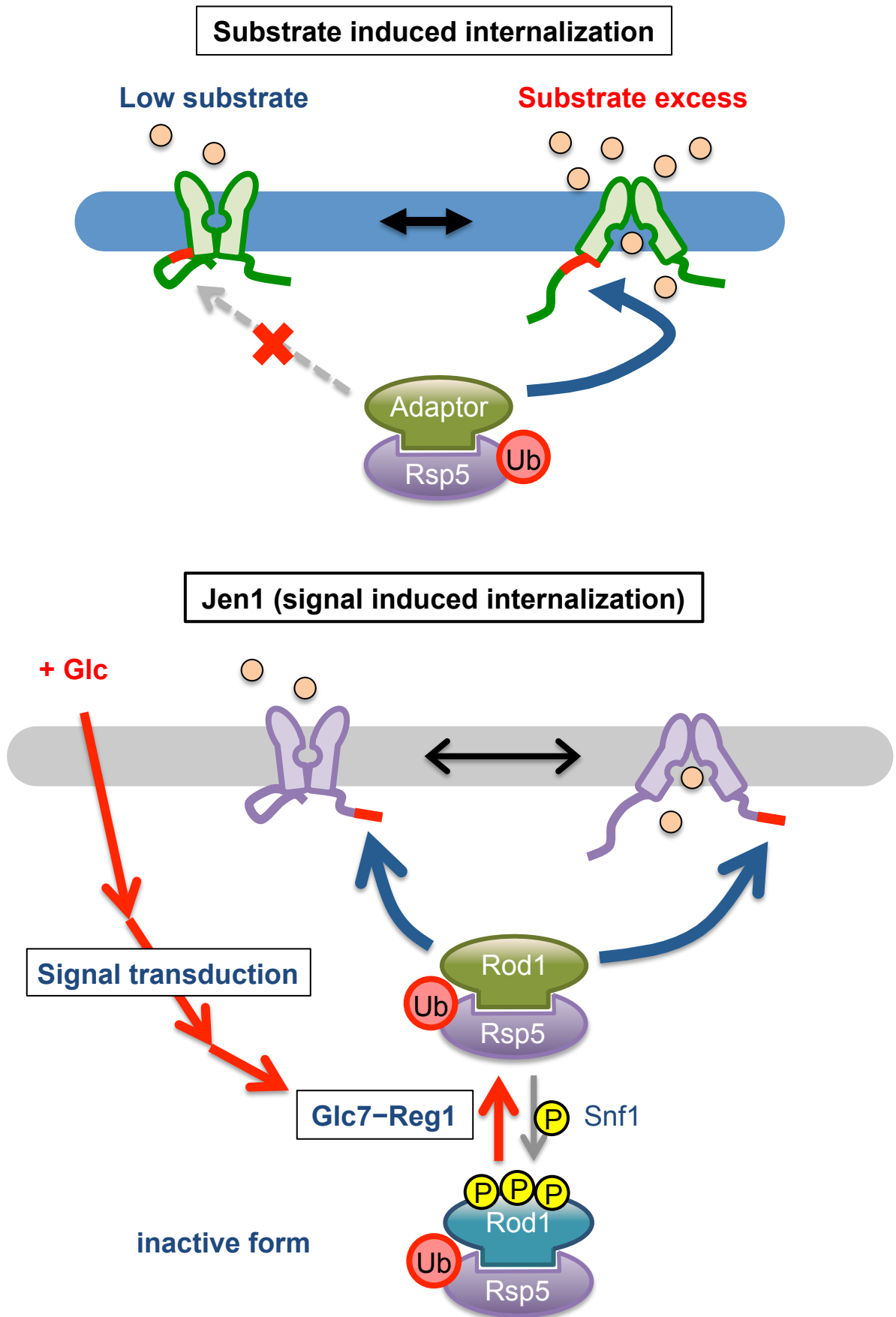


FIGURE 20. Model for substrate-induced ubiquitination of plasma membrane transporter and glucose (signal)-induced ubiquitination of Jen1

総合討論、今後の課題

これまで、環境の変化に対する細胞の応答機構に関する研究は、細胞がその変化に対応するために、どのような機構や代謝が働き始めるのか、どのような物質やタンパク質が必要であり、新たにどのようなものを生産しているのかという正の方向に注目が集まっていた。一方で、環境の変化により既存の膜輸送体が急速に除去されるといった負の制御機構は未だ不明な点が多く、またエネルギーを消費してまで厳密な制御を行う生物学的意義も不明である。私は、刻々と変化する環境中で、出芽酵母は多様な輸送体（100 種類以上）の分解をわずか 10 数種類程度のアダプターを用いてどのように制御しているのか非常に興味を持った。そこで、その制御機構を明らかとする手がかりの一つとして、アダプターによる標的の認識機構に着目し解析を行なった。

本研究では、Jen1 の分解におけるアダプタータンパク質による認識に必要な領域を探索した。その結果、Jen1 のグルコース依存的な分解における主要なアダプタータンパク質 Rod1 は Jen1 の C 末端領域を認識しており、その近傍に存在するリシン残基のユビキチン化を仲介していることが示唆された。また、興味深いことにグルコースによって分解が制御されない輸送体 Mup1 の C 末端に Jen1 の C 末端領域を付加させることで、そのキメラ輸送体は Rod1 およびグルコース依存的に分解されることが明らかとなった。この分解は、Jen1 の C 末端領域が Rod1 からの認識とユビキチン化修飾を受けたために誘導されている。すなわち、Rod1 が Jen1 の分解を制御するためには、Jen1 の C 末端領域のみで十分であることが示唆された。以上のことから、Jen1 の C 末端領域はグルコース依存的な分解において degron として機能すると結論づけた。本研究では Jen1 と Rod1 の相互作用を BiFC 法にて解析したが (Figures 8 and 12)、Mup1-Jen1C キメラ輸送体を用いた結果より (Figures 16 and 18)、Rod1 は Jen1 の degron と予測される領域のみでも十分結合できることが期待される。今後は、本研究結果を支持するために degron を保持している Jen1 C 末端領域と Rod1 間の相互作用解析を行うことが求められる。加えて、Rod1 のリン酸化あるいは脱リン酸化状態をミミックする Rod1 変異体を用いた Jen1 との相互作用解析も求められる。近年、Rod1 はグルコース依存的なユビキチン化やリン酸化修飾を受けていることが明らかとなっている (Shinoda and Kikuchi, 2007; Becuwe *et al.*, 2012; Alvaro *et al.*, 2016)。Shinoda と Kikuchi、Becuwe らにより Rod1 はグルコース非存在下では Snf1 キナーゼによりリン酸化され不活性化状態となっており、グルコース存在下では Reg1-Glc7 ホスファターゼによって脱リン酸化され活性化状態となると同時にユビキチン化修飾を受けることが報告されている。Snf1 依存的なリン酸化部位はすでに明らかとされている (Alvaro *et al.*, 2016)。Rod1 だけでなく、窒素源の量に応じて高親和性アミノ酸輸送体 Gap1 の分解を制御するアダプターとして知られる Bul1 およびそのパラログ Bul2 においても、十分なアンモニウム存在下では Sit4 依存的に脱リン酸化され、活性化し Gap1 の分解を誘導していることが報告されている (Merhi and André, 2012)。ゆえに、Rod1 のリン酸化あるいは脱リン酸化

化状態をミミックする Rod1 変異体を用いた Jen1 との相互作用解析は、Rod1 やその他のアダプタータンパク質のリン酸化状態と標的認識のより詳細な解明に役立つことが期待される。

Rod1 は、グルコース輸送体である Hxt1 や Hxt3、Hxt6、グリセロール輸送体 Stil1、および GPCR である α -フェロモン受容体 Ste2 の分解への関与が報告されている (Nikko and Pelham, 2009; Alvaro *et al.*, 2014; Becuwe and Léon, 2014; O'Donnell *et al.*, 2015)。これまでの報告により、Stil1 は輸送基質ではないグルコースの添加によって分解が誘導されることから、シグナル依存的な分解制御を受けているといえる (Becuwe and Léon, 2014)。一方で、Hxt6 は輸送基質であるグルコース依存的に分解される。今後は Rod1 によるこれら輸送体の認識機構を明らかにすることで、Rod1 による標的認識の総合的な理解が得られると期待できる。特に、グルコースシグナルによって活性化した Rod1 が Hxt6 の degron を認識するためには、Hxt6 のグルコース輸送依存的な構造変化が必要であるのか、またはシグナル依存的な認識機構が採用されることで構造変化を必要とせず認識されるのか、非常に興味深い。

また、Hxt1/3 の分解のように、グルコース存在下で原形質膜上に局在し、グルコース以外の刺激 (グルコースアナログ; 2-deoxyglucose) によって Rod1 依存的な分解が誘導される輸送体もある (O'Donnell *et al.*, 2015)。上述の通り、Rod1 はグルコース依存的に Reg1-Glc7 によって脱リン酸化され活性化状態となると同時にユビキチン化修飾を受け、Jen1 の分解を誘導していることが報告されている (Becuwe *et al.*, 2012)。それゆえ、Hxt1/3 がどのようにグルコース依存的に活性化した Rod1 による認識を回避しているのか興味を持たれる。その要因の一つとして、Rod1 による認識にソーティングシグナル依存的な輸送体の構造変化の必要性が考えられる。または、Rod1 のリン酸化修飾状態によって、制御されている可能性も考えられる。すなわち、Hxt1 や hxt3 の認識には、Rod1 がグルコース存在下で Jen1 や Hxt6 の分解に関与している時とは異なる修飾状態をとる必要性があると考えられる。これまでにグルコース培地中に 2-deoxyglucose を添加することで Snf1 が活性化することが明らかとされている (McCartney *et al.*, 2014)。Snf1 はグルコース枯渇下で活性化し、広範な遺伝子の転写抑制因子 Mig1 をリン酸化することで不活性化しているが、グルコース存在下で 2-deoxyglucose によって活性化した Snf1 は、Mig1 のリン酸化に関与しないことが示唆されている (DeVit and Johnston, 1999; McCartney *et al.*, 2014; Shashkova *et al.*, 2017)。つまり、Snf1 の 2-deoxyglucose による活性化は、グルコースの枯渇によって誘発される Snf1 の活性化とは異なる応答をしていることが示唆されている。さらに、この活性化した Snf1 依存的に Rod1 がグルコース存在下でもわずかにリン酸化されていることが報告されている (O'Donnell *et al.*, 2015)。ゆえに、Jen1 や Hxt6 の認識には影響せず、かつ Hxt1/3 の認識に必要なグルコースアナログシグナル依存的な Rod1 のリン酸化修飾が存在しており、Hxt1/3 の認識を制御しているのかもしれない。その他にも、上述した Snf1、Reg1 依存的なものとは別のリン酸化修飾による Rod1 の活性制御が考えられる。近年のアダ

プター依存的な Ste2 分解制御における報告で、Rod1 は上述した Snf1 や Reg1 だけでなく、Ypk1 キナーゼ依存的なリン酸化、および Ca^{2+} カルシニューリン依存的な脱リン酸化を受けていることが明らかとなった (Alvaro *et al.*, 2014; Alvaro *et al.*, 2016)。興味深いことに、これら 2 組のキナーゼ/ホスファターゼは、それぞれ Rod1 の異なった部位のリン酸化状態を制御している (Alvaro *et al.*, 2016)。以上より、豊富なグルコース存在下で 2-deoxyglucose を取り込んだ酵母細胞内でのみ生じる修飾状態 (Jen1 や Hxt6 の分解に関与している時とは異なるリン酸化修飾) の Rod1 によって初めて Hxt1 や Hxt3 が認識されている可能性が考えられる。非常に興味深いことに、最近の研究において、Jen1 の分解に関与する Bul1 は、従来報告されていた窒素源によるリン酸化制御に加えて、炭素源の違いによってもリン酸化状態が変化するという報告がなされた (Hovsepian *et al.*, 2018)。Bul1/2 は、十分なアンモニウムや細胞内アミノ酸の存在下で、Sit4 を介した脱リン酸化に伴い活性化し、Gap1 の分解を誘導している (Merhi and André, 2012)。一方で、Hovsepian らにより、Bul1 は炭素源が呼吸基質である乳酸培地中では、例えばアンモニウムが十分量存在している条件下でもリン酸化修飾を受けていることが明らかとされた。さらに、発酵性炭素源であるグルコースを添加することで Sit4 依存的に脱リン酸化され、Jen1 の分解に関与することが報告された (Hovsepian *et al.*, 2018)。Bul アダプターは、他にもトリプトファン輸送体 Tat2、ウラシル輸送体 Fur4、高親和性銅輸送体 Ctr1 などのエンドサイトーシスへの関与が報告されており、これらの分解シグナルは、それぞれ異なっている (Helliwell *et al.*, 2001; Soetens *et al.*, 2001; Umebayashi and Nakano, 2003; Liu *et al.*, 2007; Nikko and Pelham, 2009)。これらの分解が外界環境に依存した輸送体の修飾状態や構造によって制御されていることも考えられるが、上述のような Gap1 や Jen1 とはまた違う Bul アダプターのリン酸化による制御機構が存在する可能性も考えられる。今後、外界環境の違いによる Rod1 をはじめとしたアダプタータンパク質の修飾状態を解析することは、アダプターによる原形質膜輸送体制御機構のより詳細な解明につながるだろう。

・今後の展望

酵母の輸送体分解において得られる知見は、その他の真核生物の輸送体分解機構の解明に役立つことが期待される。例えば、哺乳動物細胞におけるグルコース輸送体 GLUT4 はグルコース濃度上昇によるインスリンシグナル依存的にその発現が脱抑制され、原形質膜上に輸送されている (Olson and Pessin, 1995; Watson and Pessin, 2006)。そして、そのエンドサイトーシス依存的な分解は、 α -アレスチン Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) によって制御される (Parikh *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013; Waldhart *et al.*, 2017b)。これまでの報告では、インスリン刺激依存的にプロテインキナーゼ B が TXNIP の 308 番目のセリン残基をリン酸化することで TXNIP を不活性化し、それによって GLUT4 がエンドサイトーシス依存的な分解を回避していることが示されている (Waldhart *et al.*, 2017)。このように、GLUT4 のエンドサイトーシスがアレスチンタンパク質を介している点や、さらにアレスチンタンパク質の機能がリン酸化によって制御

されている点は、グルコース依存的な Rod1 を介した Jen1 や Hxt6 の制御と類似している。本研究による結果や Hxt6 に対するさらなる解析は、哺乳動物細胞におけるグルコース輸送体の基質およびシグナル依存性エンドサイトーシスのメカニズムを理解するのに役立つことが期待できる。興味深いことに、甲状腺ガンを患うマウスにおいて、この TXNIP の高発現により、グルコースの流入制限、ガンの転移、腫瘍の抑制が報告されている (Morrison *et al.*, 2014)。他にも、肺ガン細胞の一部で欠損が見られる α -アレステチン ARRDC3 は、ガンの大きさや重症度と相関が見られている細胞接着分子 ITG β 4 (β 4 integrin)のエンドサイトーシスを制御していることが報告されている (Draheim *et al.*, 2010)。さらには、ARRDC3 の高発現による ITG β 4 量の抑制は腫瘍の抑制に効果があることが明らかとされた。ゆえに、今後 α -アレステチンの機能の分子基盤的な機構解明は、ガンに対する新たな治療方法の確立につながることを期待される。

輸送体のグルコース不活性化の生物学的意義

先に述べたように、アミノ酸輸送体など多くの輸送体は過剰の輸送基質の存在で分解へと導かれる。この機構には、特定の細胞内アミノ酸が過剰になるアミノ酸インバランスを防ぐ役割があると考えられる。これに対して、Jen1 はグルコースを始めとする発酵性炭素源の存在で分解が促進される。グルコースは解糖系を経てピルビン酸に変換されることを考えると、Jen1 によるピルビン酸の取り込みが並行して行われたとしても一見何も問題はないように思われる。しかし、実際には Jen1 のグルコース不活性化が起こる。外部からのピルビン酸の取り込みと解糖系によるピルビン酸の生成が同時に行われることが、細胞になんらかの不利益をもたらすのかもしれない。本研究では、グルコース存在下でも膜上に局在し続ける Jen1(Δ N, 3A)変異体という興味深い変異体が得られた。出芽酵母はグルコース（発酵性炭素源）の存在下で、呼吸基質（非発酵性炭素源）の資化経路を抑制し、グルコースを優先的に資化する。呼吸で生育していた酵母がグルコースに遭遇すると、呼吸基質の細胞内への取込みを速やかに停止する。細胞内においても、好氣的なエネルギー生産の場であるミトコンドリアへの呼吸基質（ピルビン酸）の取込みを制限する。この取込みの停止や抑制は、各オルガネラの膜輸送体のグルコース不活性化によって起こる。一方で、Jen1 の分解が抑制された株では、グルコース存在下でも輸送基質である乳酸を取り込み続けるという興味深いが報告されている (Paiva *et al.*, 2009)。本研究で得られた Jen1(Δ N, 3A)変異体が、同様にグルコース存在下でも乳酸やピルビン酸を取り込み続けるとすると、その時に何らかの代謝経路の攪乱が起こる可能性があり、今後その影響を解析することが望まれる。グルコースの添加による呼吸から発酵への移行期に生じる大規模な転写抑制やタンパク分解、代謝制御（グルコース不活性化）の生物学的意義は、未だ不明であり、長年の課題である。本研究を通して得られた Jen1(Δ N, 3A)変異体を用いることで、グルコース存在下で本来取り除かれるべきものが局在し続け、機能し続けることによる影響を解析することにより、輸送体のグルコース不活性化機構の生物学的重要性に迫ることができるのではないかと期待している。また、研究材料である出芽酵母は、古

くから醸造産業をはじめとする発酵産業において使用されており、近年ではバイオマスを変換することで得られるバイオエタノールや化成品製造にその利用が期待されている。グルコース不活性化の機構や意義の解明は、クルードバイオマスという複雑に炭素源が入り交じった培養環境中で効率的にそれらを資化しながら増殖、代謝できる株の造成につながることを期待されることから、産業的な貢献にも役立てるのではないかと考えている。

参考文献

Aguilar, R.C., Watson, H.A., and Wendland, B. (2003). The yeast Epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions. *J Biol Chem* 278, 10737-10743.

Akita, O., Nishimori, C., Shimamoto, T., Fujii, T., and Iefuji, H. (2000). Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoded pyruvate permease. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 980-984.

Alvaro, C.G., Aindow, A., and Thorner, J. (2016). Differential Phosphorylation Provides a Switch to Control How α -Arrestin Rod1 Down-regulates Mating Pheromone Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 203, 299-317.

Alvaro, C.G., O'Donnell, A.F., Prosser, D.C., Augustine, A.A., Goldman, A., Brodsky, J.L., Cyert, M.S., Wendland, B., and Thorner, J. (2014). Specific alpha-arrestins negatively regulate *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response by down-modulating the G-protein-coupled receptor Ste2. *Mol. Cell Biol.* 34, 2660-2681.

Andrade, R.P., and Casal, M. (2001). Expression of the lactate permease gene JEN1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* 32, 105-111.

Aubry, L., and Klein, G. (2013). Chapter Two - True Arrestins and Arrestin-Fold Proteins: A Structure-Based Appraisal. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Volume 118, ed. M.L. Louis: Academic Press, 21-56.

Becuwe, M., and Léon, S. (2014). Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *Elife* 3.

Becuwe, M., Vieira, N., Lara, D., Gomes-Rezende, J., Soares-Cunha, C., Casal, M., Haguenauer-Tsapis, R., Vincent, O., Paiva, S., and Leon, S. (2012). A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J. Cell Biol.* 196, 247-259.

Bedford, M.T., Chan, D.C., and Leder, P. (1997). FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J* 16, 2376-2383.

Boase, N.A., and Kumar, S. (2015). NEDD4: The founding member of a family of ubiquitin-protein ligases. *Gene* 557, 113-122.

Brown, C.R., Hung, G.C., Dunton, D., and Chiang, H.L. (2010). The TOR complex 1 is distributed in endosomes and in retrograde vesicles that form from the vacuole membrane and plays an important role in the vacuole import and degradation pathway. *J Biol Chem* 285, 23359-23370.

Cain, N.E., and Kaiser, C.A. (2011). Transport activity-dependent intracellular sorting of the yeast general amino acid permease. *Mol. Biol. Cell* 22, 1919-1929.

Chambers, P., Issaka, A., and Palecek, S.P. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* *JEN1* promoter activity is inversely related to concentration of repressing sugar. *Appl Environ Microbiol* 70, 8-17.

Chang, C.I., Schandel, K.A., and Jenness, D.D. (2014). Interaction among *Saccharomyces cerevisiae* pheromone receptors during endocytosis. *Biol. Open* 3, 297-306.

Chen, S.J., Wu, X., Wadas, B., Oh, J.H., and Varshavsky, A. (2017). An N-end rule pathway that recognizes proline and destroys gluconeogenic enzymes. *Science* 355.

Crapeau, M., Merhi, A., and André, B. (2014). Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like Bul and Aly proteins. *J Biol Chem* 289, 22103-22116.

DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.

DeVit, M.J., and Johnston, M. (1999). The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 9, 1231-1241.

Draheim, K.M., Chen, H.B., Tao, Q., Moore, N., Roche, M., and Lyle, S. (2010). ARRDC3 suppresses breast cancer progression by negatively regulating integrin beta4. *Oncogene* 29, 5032-5047.

Eden, E.R., Huang, F., Sorkin, A., and Futter, C.E. (2012). The role of EGF receptor ubiquitination in regulating its intracellular traffic. *Traffic* 13, 329-337.

Epping, E.A., and Moye-Rowley, W.S. (2002). Identification of interdependent signals required for anterograde traffic of the ATP-binding cassette transporter protein Yor1p. *J Biol Chem* 277, 34860-34869.

Farrell, K.B., Grossman, C., and Di Pietro, S.M. (2015). New Regulators of Clathrin-Mediated Endocytosis Identified in *Saccharomyces cerevisiae* by Systematic Quantitative Fluorescence Microscopy. *Genetics* 201, 1061-1070.

Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C., and Brandt, A. (2005). A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16, 2068-2076.

Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 334-361.

Gander, S., Bonenfant, D., Altermatt, P., Martin, D.E., Hauri, S., Moes, S., Hall, M.N., and Jenoe, P. (2008). Identification of the rapamycin-sensitive phosphorylation sites within the Ser/Thr-rich domain of the yeast Npr1 protein kinase. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22, 3743-3753.

Ghaddar, K., Merhi, A., Saliba, E., Krammer, E.M., Prevost, M., and Andre, B. (2014a). Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Mol. Cell Biol.* 34, 4447-4463.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30, e23.

Guiney, E.L., Klecker, T., and Emr, S.D. (2016). Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex. *Mol Biol Cell* 27, 4043-4054.

Hardie, D.G., Carling, D., and Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67, 821-855.

Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenő, P., Sagliocco, F., and Boucherie, H. (2001). The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276, 76-85.

Hedges, D., Proft, M., and Entian, K.D. (1995). CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 1915-1922.

Heineman, T.C., Connolly, P., Hall, S.L., and Assefa, D. (2004). Conserved cytoplasmic domain sequences mediate the ER export of VZV, HSV-1, and HCMV gB. *Virology* 328, 131-141.

Helliwell, S.B., Losko, S., and Kaiser, C.A. (2001). Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J Cell Biol* 153, 649-662.

Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8839-8843.

Horák, J. (2013). Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Curr Genet* 59, 1-31.

Hovsepian, J., Albanèse, V., Becuwe, M., Ivashov, V., Teis, D., and Léon, S. (2018). The yeast arrestin-related protein Bull1 is a novel actor of glucose-induced endocytosis. *Mol Biol Cell* 29, 1012-1020.

Hovsepian, J., Defenouillère, Q., Albanèse, V., Váchová, L., Garcia, C., Palková, Z., and Léon, S. (2017). Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. *J Cell Biol.* (Published online)

Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5249.

Hung, G.C., Brown, C.R., Wolfe, A.B., Liu, J., and Chiang, H.L. (2004). Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *J Biol Chem* 279, 49138-49150.

Hämmerle, M., Bauer, J., Rose, M., Szallies, A., Thumm, M., Düsterhus, S., Mecke, D., Entian, K.D., and Wolf, D.H. (1998). Proteins of newly isolated mutants and the amino-terminal proline are essential for ubiquitin-proteasome-catalyzed catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 25000-25005.

Inoue, K., Akita, N., Yamashita, S., Shiba, T., and Fujita, T. (1990). Constitutive and inducible expression of a transgene directed by heterologous promoters in a trout liver cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1311-1316.

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., and Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.

Kang, Y., Gao, X., Zhou, X.E., He, Y., Melcher, K., and Xu, H.E. (2016). A structural snapshot of the rhodopsin-arrestin complex. *FEBS J* 283, 816-821.

Kang, Y., Zhou, X.E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T.A., Yefanov, O., Han, G.W., Xu, Q., de Waal, P.W., Ke, J., Tan, M.H., Zhang, C., Moeller, A., West, G.M., Pascal, B.D., Van Eps, N., Caro, L.N., Vishnivetskiy, S.A., Lee, R.J., Suino-Powell, K.M., Gu, X., Pal, K., Ma, J., Zhi, X., Boutet, S., Williams, G.J., Messerschmidt, M., Gati, C., Zatsepin, N.A., Wang, D., James, D., Basu, S., Roy-Chowdhury, S., Conrad, C.E., Coe, J., Liu, H., Lisova, S., Kupitz, C., Grotjohann, I., Fromme, R., Jiang, Y., Tan, M., Yang, H., Li, J., Wang, M., Zheng, Z., Li, D., Howe, N., Zhao, Y., Standfuss, J., Diederichs, K., Dong, Y., Potter, C.S., Carragher, B., Caffrey, M., Jiang, H., Chapman, H.N., Spence, J.C., Fromme, P., Weierstall, U., Ernst, O.P., Katritch, V., Gurevich, V.V., Griffin, P.R., Hubbell, W.L., Stevens, R.C., Cherezov, V., Melcher, K., and Xu, H.E. (2015). Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* 523, 561-567.

Keener, J.M., and Babst, M. (2013). Quality control and substrate-dependent downregulation of the nutrient transporter Fur4. *Traffic* 14, 412-427.

Kerppola, T.K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37, 465-487.

Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R., and André, B. (2010). The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol* 20, 196-204.

Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (2008). Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714-725.

Liu, J., Sitaram, A., and Burd, C.G. (2007). Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic* 8, 1375-1384.

Llopis-Torregrosa, V., Ferri-Blázquez, A., Adam-Artigues, A., Deffontaines, E., van Heusden, G.P., and Yenush, L. (2016). Regulation of the Yeast Hxt6 Hexose Transporter by the Rod1 α -Arrestin, the Snf1 Protein Kinase, and the Bmh2 14-3-3 Protein. *J Biol Chem* 291, 14973-14985.

Lodi, T., Fontanesi, F., and Guiard, B. (2002). Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast: the role of the lactate permease gene JEN1. *Mol Genet Genomics* 266, 838-847.

López-Boado, Y.S., Herrero, P., Gascón, S., and Moreno, F. (1987). Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 147, 231-234.

MacGurn, J.A., Hsu, P.C., Smolka, M.B., and Emr, S.D. (2011). TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell* 147, 1104-1117.

Malkus, P., Jiang, F., and Schekman, R. (2002). Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J Cell Biol* 159, 915-921.

McCartney, R.R., Chandrashekarappa, D.G., Zhang, B.B., and Schmidt, M.C. (2014). Genetic analysis of resistance and sensitivity to 2-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 198, 635-646.

Menssen, R., Schweiggert, J., Schreiner, J., Kusevic, D., Reuther, J., Braun, B., and Wolf, D.H. (2012). Exploring the topology of the Gid complex, the E3 ubiquitin ligase involved in catabolite-induced degradation of gluconeogenic enzymes. *J Biol Chem* 287, 25602-25614.

Merhi, A., and Andre, B. (2012). Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol. Cell Biol.* 32, 4510-4522.

Merhi, A., Gérard, N., Lauwers, E., Prévost, M., and André, B. (2011). Systematic mutational analysis of the intracellular regions of yeast Gap1 permease. *PLoS One* 6, e18457.

Merrifield, C.J., and Kaksonen, M. (2014). Endocytic accessory factors and regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016733.

Morrison, J.A., Pike, L.A., Sams, S.B., Sharma, V., Zhou, Q., Severson, J.J., Tan, A.C., Wood, W.M., and Haugen, B.R. (2014). Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a novel tumor suppressor in thyroid cancer. *Mol Cancer* 13, 62.

Munn, A.L., Stevenson, B.J., Geli, M.I., and Riezman, H. (1995). end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 6, 1721-1742.

Nabhan, J.F., Pan, H., and Lu, Q. (2010). Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO Rep* 11, 605-611.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20, 87-90.

Nikko, E., and Pelham, H.R. (2009). Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* 10, 1856-1867.

Nikko, E., Sullivan, J.A., and Pelham, H.R. (2008). Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep* 9, 1216-1221.

Novoselova, T.V., Zahira, K., Rose, R.S., and Sullivan, J.A. (2012). Bul proteins, a nonredundant, antagonistic family of ubiquitin ligase regulatory proteins. *Eukaryot. Cell* 11, 463-470.

O'Donnell, A.F., Huang, L., Thorner, J., and Cyert, M.S. (2013). A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α -arrestin Aly1/Art6. *J Biol Chem* 288, 24063-24080.

O'Donnell, A.F., McCartney, R.R., Chandrashekarappa, D.G., Zhang, B.B., Thorner, J., and Schmidt, M.C. (2015). 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and α -arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. *Mol Cell Biol* 35, 939-955.

Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., and Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res* 25, 451-452.

Olson, A.L., and Pessin, J.E. (1995). Transcriptional regulation of the human GLUT4 gene promoter in diabetic transgenic mice. *J Biol Chem* 270, 23491-23495.

Paiva, S., Kruckeberg, A.L., and Casal, M. (2002). Utilization of green fluorescent protein as a marker for studying the expression and turnover of the monocarboxylate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 363, 737-744.

Paiva, S., Vieira, N., Nondier, I., Haguenaue-Tsapis, R., Casal, M., and Urban-Grimal, D. (2009). Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter: role of lysine 63-linked ubiquitin chains. *J Biol Chem* 284, 19228-19236.

Parikh, H., Carlsson, E., Chutkow, W.A., Johansson, L.E., Storgaard, H., Poulsen, P., Saxena, R., Ladd, C., Schulze, P.C., Mazzini, M.J., Jensen, C.B., Krook, A., Bjornholm, M., Tornqvist, H., Zierath, J.R., Ridderstrale, M., Altshuler, D., Lee, R.T., Vaag, A., Groop, L.C., and Mootha, V.K. (2007a). TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med.* 4, e158.

Patwari, P., Emilsson, V., Schadt, E.E., Chutkow, W.A., Lee, S., Marsili, A., Zhang, Y., Dobrin, R., Cohen, D.E., Larsen, P.R., Zavacki, A.M., Fong, L.G., Young, S.G., and Lee, R.T. (2011). The arrestin domain-containing 3 protein regulates body mass and energy expenditure. *Cell Metab* 14, 671-683.

Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21, 921-926.

Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55-72.

Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M., and Entian, K.D. (1997). Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol Cell Biol* 17, 2502-2510.

Risinger, A.L., and Kaiser, C.A. (2008). Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Mol Biol Cell* 19, 2962-2972.

Rubenstein, E.M., McCartney, R.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Shirra, M.K., Arndt, K.M., and Schmidt, M.C. (2008). Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. *J Biol Chem* 283, 222-230.

Santt, O., Pfirrmann, T., Braun, B., Juretschke, J., Kimmig, P., Scheel, H., Hofmann, K., Thumm, M., and Wolf, D.H. (2008). The yeast GID complex, a novel ubiquitin ligase (E3) involved in the regulation of carbohydrate metabolism. *Mol Biol Cell* 19, 3323-3333.

Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J., and Hall, M.N. (1998). The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J* 17, 6924-6931.

Scott, P.M., Bilodeau, P.S., Zhdankina, O., Winistorfer, S.C., Hauglund, M.J., Allaman, M.M., Kearney, W.R., Robertson, A.D., Boman, A.L., and Piper, R.C. (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 6, 252-259.

Sevier, C.S., Weisz, O.A., Davis, M., and Machamer, C.E. (2000). Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs. *Mol Biol Cell* 11, 13-22.

Shashkova, S., Wollman, A.J.M., Leake, M.C., and Hohmann, S. (2017). The yeast Mig1 transcriptional repressor is dephosphorylated by glucose-dependent and -independent mechanisms. *FEMS Microbiol Lett* 364.

Shih, S.C., Katzmann, D.J., Schnell, J.D., Sutanto, M., Emr, S.D., and Hicke, L. (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 4, 389-393.

Shinoda, J., and Kikuchi, Y. (2007). Rod1, an arrestin-related protein, is phosphorylated by Snf1-kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 258-263.

Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.Y., Paduch, M., Tripathi-Shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W.I., Kossiakoff, A.A., Kobilka, B.K., and Lefkowitz, R.J. (2013). Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497, 137-141.

Shukla, A.K., Westfield, G.H., Xiao, K., Reis, R.I., Huang, L.Y., Tripathi-Shukla, P., Qian, J., Li, S., Blanc, A., Oleskie, A.N., Dosey, A.M., Su, M., Liang, C.R., Gu, L.L., Shan, J.M., Chen, X., Hanna, R., Choi, M., Yao, X.J., Klink, B.U., Kahsai, A.W., Sidhu, S.S., Koide, S., Penczek, P.A., Kossiakoff, A.A., Jr, V.L.W., Kobilka, B.K., Skiniotis, G., and Lefkowitz, R.J. (2014). Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* 512, 218-222.

Soetens, O., De Craene, J.O., and Andre, B. (2001). Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem* 276, 43949-43957.

Springael, J.Y., and André, B. (1998). Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9, 1253-1263.

Stamenova, S.D., Dunn, R., Adler, A.S., and Hicke, L. (2004). The Rsp5 ubiquitin ligase binds to and ubiquitinates members of the yeast CIN85-endophilin complex, Sla1-Rvs167. *J Biol Chem* 279, 16017-16025.

Stamenova, S.D., French, M.E., He, Y., Francis, S.A., Kramer, Z.B., and Hicke, L. (2007). Ubiquitin binds to and regulates a subset of SH3 domains. *Mol Cell* 25, 273-284.

Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J., Schmidt, M.C., and Hardie, D.G. (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol* 13, 1299-1305.

Talaia, G., Gournas, C., Saliba, E., Barata-Antunes, C., Casal, M., Andre, B., Diallinas, G., and Paiva, S. (2017). The alpha-arrestin Bullp mediates lactate transporter endocytosis in response to alkalinization and distinct physiological signals. *J. Mol. Biol.* 429, 3678-3695.

Tonikian, R., Xin, X., Toret, C.P., Gfeller, D., Landgraf, C., Panni, S., Paoluzi, S., Castagnoli, L., Currell, B., Seshagiri, S., Yu, H., Winsor, B., Vidal, M., Gerstein, M.B., Bader, G.D., Volkmer, R., Cesareni, G., Drubin, D.G., Kim, P.M., Sidhu, S.S., and Boone, C. (2009). Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS Biol* 7, e1000218.

Toshima, J.Y., Nakanishi, J., Mizuno, K., Toshima, J., and Drubin, D.G. (2009). Requirements for recruitment of a G protein-coupled receptor to clathrin-coated pits in budding yeast. *Mol Biol Cell* 20, 5039-5050.

Umebayashi, K., and Nakano, A. (2003). Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J Cell Biol* 161, 1117-1131.

Waldhart, A.N., Dykstra, H., Peck, A.S., Boguslawski, E.A., Madaj, Z.B., Wen, J., Veldkamp, K., Hollowell, M., Zheng, B., Cantley, L.C., McGraw, T.E., and Wu, N. (2017a). Phosphorylation of TXNIP by AKT Mediates Acute Influx of Glucose in Response to Insulin. *Cell Rep* 19, 2005-2013.

Watson, R.T., and Pessin, J.E. (2006). Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem Sci* 31, 215-222.

Weinberg, J.S., and Drubin, D.G. (2014). Regulation of clathrin-mediated endocytosis by dynamic ubiquitination and deubiquitination. *Curr Biol* 24, 951-959.

Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T.E., Kahn, B.B., and Cantley, L.C. (2013). AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell* 49, 1167-1175.

Yin, Z., Wilson, S., Hauser, N.C., Tournu, H., Hoheisel, J.D., and Brown, A.J. (2003). Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. *Mol Microbiol* 48, 713-724.

Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., and Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J Biol Chem* 278, 26146-26158.

Zaragoza, O., Vincent, O., and Gancedo, J.M. (2001). Regulatory elements in the FBP1 promoter respond differently to glucose-dependent signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 359, 193-201.

机 伸太郎 2008

モノカルボン酸輸送体 Jen1 の局在と選択的ターンオーバーに関する研究
東北大学大学院 農学研究科 修士論文

大橋 優隆 2010

出芽酵母におけるアレスチン関連タンパク質 Art4 によるグルコース依存的なモノカルボン酸輸送体 Jen1 の分解制御
東北大学大学院 農学研究科 修士論文

葛西 寛一 2011

出芽酵母におけるユビキチンリガーゼ Rsp5 のアダプタータンパク質群によるモノカルボン酸輸送体 Jen1 の分解制御に関する研究
東北大学大学院 農学研究科 修士論文

佐藤 大地 2012

出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 の細胞内輸送における選別機構の解析
東北大学大学院 農学研究科 修士論文

原著論文

Fujita, S., Sato, D., Kasai, H., Ohashi, M., Tsukue, S., Gomi, K., and Shintani, T. (2018)
The carboxy-terminal region of the yeast monocarboxylate transporter Jen1 acts as a glucose signal-responding degron recognized by the α -arrestin Rod1. *J. Biol. Chem.* 293(28):10926-10936. (doi: 10.1074/jbc.RA117.001062.)

謝辞

本博士論文を作成するにあたり、ご指導、ご教示賜りました東北大学大学院農学研究科遺伝子情報システム学分野准教授 新谷 尚弘 博士、同教授 五味 勝也 博士、同助教授 渡部 昭 博士に感謝申し上げます。

本博士論文の副査を引き受けていただきました、東北大学大学院農学研究科 応用微生物学分野教授 阿部 敬悦 博士、植物細胞生化学分野教授 宮尾 光恵 博士に厚く御礼申し上げます。